



***Apis mellifera unicolor* (Latreille 1804, Hymenoptera Apidae) et *Varrroa destructor* (Anderson and Trueman, 2000, Acari: Varroidae) à Madagascar : diversité génétique, impact et comportement hygiénique**

Henriette Rasolofoarivao

► **To cite this version:**

Henriette Rasolofoarivao. *Apis mellifera unicolor* (Latreille 1804, Hymenoptera Apidae) et *Varrroa destructor* (Anderson and Trueman, 2000, Acari: Varroidae) à Madagascar : diversité génétique, impact et comportement hygiénique. Biodiversité et Ecologie. Université de la Réunion, 2014. Français. NNT : 2014LARE0032 . tel-01223831

HAL Id: tel-01223831

<https://theses.hal.science/tel-01223831>

Submitted on 3 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de La Réunion

Ecole doctorale sciences et technologies santé

Et

Université d'Antananarivo

Ecole doctorale Sciences de la vie et de l'environnement

Apis mellifera unicolor (Latreille, 1804, Hymenoptera: Apidae) et *Varrroa destructor* (Anderson and Trueman, 2000, Acari : Varroidae) à Madagascar :
diversité génétique, impact et comportement hygiénique

Thèse en cotutelle pour l'obtention de diplôme doctorat en Sciences

Présentée et soutenue publiquement le 28 novembre 2014

par RASOLOFOARIVAO Henriette

Directeurs de thèse :

Reynaud Bernard, Chercheur, H.D.R., CIRAD

Raveloson Ravaomanarivo Lala Harivelo, Maître de Conférences, H.D.R., Université d'Antananarivo

Encadrantes de thèse :

Clemencet Johanna, Maître de Conférences, Université de La Réunion

Delatte Hélène, Chercheur, H.D.R., CIRAD

Membres du Jury :

Strasberg Dominique, Professeur H.D.R, Université de La Réunion, Président

Jeannoda Victor, Professeur H.D.R, Université d'Antananarivo Rapporteur

Le Conte Yves, Directeur de Recherches H.D.R, INRA, Avignon-France Rapporteur

Blot Nicolas, Maître de Conférences H.D.R, Université de Clermont- Ferrand Examinateur

REMERCIEMENTS

« Une seule abeille n'est pas une colonie », « un nid d'abeille ne se fait pas par une abeille toute seule ». Cette thèse (2011-2014) touche à sa fin, c'est grâce à l'appui de différentes personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme; j'adresse mes vifs remerciements à:

L'ensemble de jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail ainsi que le temps qu'ils ont consacré à cette thèse.

Mes directeurs de thèse, Reynaud Bernard et Raveloson Ravaomanarivo Lala H. de m'avoir soutenue depuis le début dans la réalisation de cette thèse. Leurs disponibilités et leurs généreux secours au cours de certains moments difficiles ont été d'une très grande qualité et d'un immense réconfort.

Clemencet Johanna et Delatte Hélène pour leurs encadrements, leur efficacité et les corrections pertinentes aussi bien sur les articles que le manuscrit de la thèse. Sans elles, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail. Elles ont été disponibles jusqu'au bout pour les derniers détails.

Chauzat Marie Pierre, Le Conte Yves, Lionel Garnery d'avoir accompagné mon travail à travers mes deux comités de thèse, ils m'ont prodigué d'utiles conseils qui m'ont aidé à bien structurer mon étude.

Toutes les personnes qui ont participé aux travaux de laboratoire en particulier Simiand Christophe et Speck Adrien.

Chiroleu Frédéric et Le Squin Sandrine pour leur contribution à l'analyse statistique. L'équipe SRI de Madagascar pour la formation SIG.

Razafindrazaka D. et Randrianaivoariseta N. qui m'ont accompagné sur les terrains et qui me soutiennent tout le temps par la force et l'énergie qu'ils m'ont prodigué.

A tous mes amis et tous les thésard (e) (s) pour leur soutien et les moments de détente qui m'ont fait décompresser pendant ma thèse.

Ma famille pour leur soutien, l'encouragement et surtout qui a pu supporter mon éloignement durant mes travaux de terrain et durant mon séjour à La Réunion.

Mon pays, Madagascar, qui m'a permis de faire cette thèse en me fournissant les ressources nécessaires disponibles (son unique abeille endémique, et son délicieux miel).

Que tous ceux qui ont contribué à faciliter la collecte d'abeille dans le cadre de cette étude trouvent le témoignage de ma sincère gratitude.

Ce travail de thèse a été fait à la fois au sein du :

-Centre de Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) rattaché à l'unité mixte de recherche « Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical » (UMR PVBMT), je voudrais impérativement remercier l'équipe dirigée par Delatte Hélène, tous les personnels, du « Pôle Protection de Plantes » (3P) avec qui j'ai travaillé au moins pendant 2 ans.

-Département Entomologie, Université Antananarivo, dirigé par Randrianarisoa Ernest, je tiens à exprimer mes remerciements à tous mes professeurs durant les années universitaires.

-Faculté de Science et Technologies, Université de La Réunion

Cette thèse a pu être réalisée grâce à différents financements:

-Une bourse CIRAD- Sud, qui m'a été allouée par l'Agence Inter-établissements de Recherche pour le Développement (AIRD, sous la gestion de Monet Elise et Kente Nabil). Cette bourse vise à consolider les potentiels de recherche des pays du Sud.

-Un soutien financier du projet ePRPV « Elargissement et Pérennisation du Réseau de Protection des Végétaux ».

-Une aide financière de l'Union européenne, du gouvernement Français, de la Région et du Département Réunion.

Je souhaite une bonne continuation pour les doctorants en cours de préparation ou les futurs doctorants en particulier ceux qui sont dans le cadre « abeille et pollen » : Técher Maeva, Olivier Esnault, Rasoloarijao Tsiory M., Razafindrazaka Dimbiarimanga.

Résumé

Madagascar figure parmi les cinq premiers pays « *hot spots* » prioritaires pour la conservation de la biodiversité mondiale. Par sa flore mellifère abondante et variée, Madagascar est désignée comme pays à vocation apicole. L'abeille endémique *A. m. unicolor* occupe tous les milieux, quel que soit le type de climat et la topographie. Cependant, les milieux isolés, tels que les îles sont fragiles et plus susceptibles aux invasions des espèces exotiques. Depuis 2010, *V. destructor* a été introduit à Madagascar et risque de modifier les équilibres biologiques aussi bien dans les ruches que dans le milieu naturel.

Les objectifs de cette thèse étaient: i) d'étudier la diversité et la structure génétique de l'abeille *A. m. unicolor* et de l'acarien *V. destructor* à Madagascar, ii) d'évaluer l'impact de *V. destructor* sur les colonies d'abeille, ii) étudier le comportement hygiénique des colonies d'abeilles face à son parasite *V. destructor*. Nos résultats confirment que l'ensemble des échantillons collectés à Madagascar font partie de la lignée évolutive africaine, plus de 99% ont été identifiés comme *A. m. unicolor*. Malgré sa faible diversité nucléaire, les populations présentent une structuration génétique organisée en deux sous clusters correspondant à des régions géographiques.

Une seule lignée de *V. destructor* a été détectée à Madagascar, l'haplotype coréen (K1-1) qui est la lignée la plus répandue au monde et aussi présente en Afrique. Les études génétiques ont montré une proportion élevée de génotype homozygote (69.5%) et également un nombre élevé de MLG sur les Hauts Plateaux par rapport à la côte Est. La présence de MLG particulier sur les Hauts Plateaux conforte l'hypothèse de son introduction dans la capitale. La propagation de *V. destructor* à Madagascar est relativement lente en comparaison avec celles observées dans les pays africains. Sa dispersion reste encore confinée à certaines régions des Hauts Plateaux et de la côte Est. L'impact de l'ectoparasite est sévère, en un an (en 2012), la perte des colonies infestées est estimée à 60 %, ceci est inférieur à ce qui a été observé en Europe, où beaucoup plus de colonies se sont effondrées dans les premiers stades d'infestation.

En se basant sur le pourcentage des cellules nettoyées après 6 h de test de comportement hygiénique à l'aiguille, l'efficacité des colonies d' *A. m. unicolor* à détecter et à désoperculer les cellules est comparable à celles des abeilles hygiéniques africanisées et semble beaucoup plus élevée que celle des abeilles européennes. La présence de certaines colonies hautement hygiéniques au sein des populations d'*A. m. unicolor* offre une opportunité pour un futur programme de sélection de souches tolérantes à Madagascar.

Abstract

Madagascar is among the top five priorities "hotspots" for global biodiversity conservation. In Madagascar, melliferous flora is diverse and abundant; the endemic honey bee *Apis mellifera unicolor* inhabits all areas regardless of the climatic conditions and topography. As other islands, Madagascar is fragile and susceptible to invasions of alien species. In 2010, *Varroa destructor* has been reported parasitizing *A. m. unicolor*. The ectoparasite is not only a serious threat to beekeeping in Madagascar but it may also alter ecosystems balance.

The objectives of this thesis were i) to study the genetic diversity and population structure of both *A. m. unicolor* and *V. destructor* in Madagascar, ii) to estimate the impact of *V. destructor* on honey bee colonies, and iii) to investigate the hygienic behaviour of honey bee colonies toward *V. destructor* mites.

Our results confirm that all honey bees collected in Madagascar belonged to the African evolutionary lineage and more than 99% were identified as *A. m. unicolor*. Despite its low nuclear genetic diversity, two genetic clusters have been detected, corresponding to geographic regions.

In Madagascar, only one genetic strain of *V. destructor* was detected, the Korean haplotype (K1-1) which is the most widespread lineage in the world and the one present in Africa. Genetic studies showed a higher proportion of homozygous genotype (69.5%) and also a high number of MLG (Multi- Locus Genotypes) in the High Lands compared to the East coast. The presence of particular MLG on the High Land reinforces the assumption of its introduction into the capital. The spread of *V. destructor* in Madagascar is relatively slow in comparison with those observed in African countries. Its presence remains confined to the High Land and the East coast.

The impact of the parasite on *A. m. unicolor* was severe; with about 60% of colony losses in a year reported in 2012. Nevertheless, this is less than observed in Europe, where many more colonies died at the early stage of infestation.

Based on the percentage of cleaned cells observed 6 hour after pin killing the brood, the efficiency of *A. m. unicolor* colonies to detect and uncap cells was comparable to those of Africanised hygienic honey bees and was much higher than those of European honey bees. In Madagascar, the detection of highly hygienic colonies of *A. m. unicolor* is a great opportunity to develop a programme of selection of tolerant honey bee strains.

SOMMAIRES

INTRODUCTION GENERALE	9
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
I- Biogéographie de Madagascar	13
II- Modèle biologique 1 : l'abeille <i>A. mellifera</i>	19
II.1-Systématique.....	19
II.2- Castes d'abeille	21
II.3-Cycle de développement de l'abeille	23
II.4-Reproduction de l'abeille.....	24
II.5-Apiculture à Madagascar	25
III-Modèle biologique 2 : l'acarien <i>V. destructor</i>	28
III.1-Taxonomie et historique d'invasion	28
III.2-Interaction hôte (<i>A. mellifera</i>) - parasite (<i>V. destructor</i>)	32
III.3-Pathogénicité et virulence.....	34
III.4- Facteurs limitant du développement de <i>V. destructor</i>	35
OBJECTIFS.....	41
DIVERSITE GENETIQUE DE L'ABEILLE ENDEMIQUE MALGACHE <i>APIS MELLIFERA UNICOLOR</i> (HYMENOPTERA : APIDAE).....	43
Résumé.....	43
GENETIC DIVERSITY OF THE ENDEMIC HONEYBEE: <i>APIS MELLIFERA UNICOLOR</i> (HYMENOPTERA: APIDAE) IN MADAGASCAR	44
Abstract.....	44
Introduction	45
Materials and methods	45
Results	52
Discussion.....	60
Acknowledgments	62
References	63

DISPERSION ET DETERMINATION DE LA SOUCHE DE *VARROA DESTRUCTOR* (ACARI: VARROIDAE) A MADAGASCAR DEPUIS SA PREMIERE DESCRIPTION EN 2010..... 68

Résumé..... 68

SPREAD AND STRAIN DETERMINATION OF *VARROA DESTRUCTOR* (ACARI: VARROIDAE) IN MADAGASCAR SINCE ITS FIRST REPORT IN 2010 69

Abstract..... 69

Introduction 70

Materials and methods 70

Results 74

Discussion..... 77

Acknowledgements 80

References 81

DIVERSITE GENETIQUE DE *VARROA DESTRUCTOR* (MESOSTIGMATA: VARROIDEA), UNE ESPECE INVASIVE DECRITE SUR L'ABEILLE *APIS MELLIFERA UNICOLOR* (HYMENOPTERA: APOIDEA) 85

Résumé..... 85

NUCLEAR GENETIC DIVERSITY OF *VARROA DESTRUCTOR* (MESOSTIGMATA: VARROIDEA), INVASIVE SPECIES REPORTED IN HONEY BEE *APIS MELLIFERA UNICOLOR* (HYMENOPTERA: APOIDEA) 86

Abstract..... 86

Introduction 87

Materials and methods 88

Results 94

Discussion..... 100

Acknowledgments 102

References 103

ETUDE DU COMPORTEMENT HYGIENIQUE D'*APIS MELLIFERA UNICOLOR* (HYMENOPTERA: APIDAE), L'ABEILLE ENDEMIQUE DE MADAGASCAR..... 107

Résumé.....	107
 ASSESSING HYGIENIC BEHAVIOR OF <i>APIS MELLIFERA UNICOLOR</i> (HYMENOPTERA: APIDAE), THE ENDEMIC HONEY BEE FROM MADAGASCAR.....	
Abstract.....	108
Introduction	109
Material and methods	110
DISCUSSION.....	117
Acknowledgments	118
References	119
 DISCUSSION GENERALE.....	
Diversité génétique de l'abeille <i>A. m. unicolor</i>	127
Impacts de <i>V. destructor</i> à Madagascar	128
Dynamique de propagation, la voie d'introduction et diversité génétique de <i>V. destructor</i>	129
Solutions pour lutter contre le <i>V. destructor</i>	130
Comportement hygiénique de l'abeille <i>A. m. unicolor</i>	131
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	
REFERENCES.....	135

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les abeilles, en particulier les abeilles domestiques, sont connues pour leur rôle de pollinisateurs (Michener, 2000). Elles participent à la pollinisation des plantes cultivées comme les arbres fruitiers, les légumes et le fourrage, ainsi que les plantes qui peuvent intervenir dans la fabrication des biocarburants (Gallai et al., 2009; Vaknin, 2012). Du point de vue environnemental, la pollinisation assure le maintien de la biodiversité végétale (Hadley and Betts, 2012). Dans le domaine agricole, la pollinisation améliore la qualité et la quantité de la production (Free, 1970). Pour les cultures industrielles, il a été démontré une augmentation des productions parallèlement à l'augmentation du nombre de ruches par hectare (Barbier, 1964). Ainsi, les agriculteurs louent et installent des ruches dans leurs champs pour augmenter leur récolte (Klein et al., 2007); L'abeille domestique est aussi connue pour la production de miel et autres produits apicoles (Free, 1970), d'où sa nomenclature *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) ou abeille mellifère.

Apis mellifera est exploitée par l'homme depuis 7000 ans (Crane, 1990). Son origine est aujourd'hui discutée, l'espèce pourrait avoir une origine asiatique (Dietz, 1982; Rothenbuhler, 1979) ou Proche orientale (Rutner et al., 1978), d'autres études indiqueraient une origine africaine de l'abeille *A. mellifera* (Han et al., 2012; Whitfield et al., 2006; Wilson, 1971).

Apis mellifera s'est différenciée en quatre lignées évolutives (Alburaki et al., 2013; Estoup et al., 1995; Franck et al., 2001; Garnery et al., 1992; Garnery et al., 1993; Han et al., 2012; Scott Schneider et al., 2004). Chacune de ces lignées s'est diversifiée en plusieurs sous espèces. Au total 29 sous espèces ont été décrites jusqu'à présent sur la base de caractères morphologiques, génétiques, écologiques et comportementaux (Meixner et al., 2011; Meixner et al., 2013; Ruttner, 1988; Sheppard and Meixner, 2003).

Apis mellifera unicolor (Latreille, 1804) est une sous-espèce insulaire endémique de Madagascar et est qualifiée comme la plus petite du genre *Apis* (Ruttner, 1988). Elle est reconnue par sa couleur uniformément noire avec un proboscis court et des ailes antérieures longues (Ruttner, 1988). Cette sous espèce occupe tous les milieux, quel que soit le climat (sec ou humide) et la topographie (altitude ou plaine) (Ralalaharisoa-Ramamonjisoa et al., 1996). Deux écotypes ont été décrit, l'un se développe près de la côte et a un comportement

très agressif avec une tendance marquée à la désertion, l'autre, présent sur les Hauts Plateaux, est plus doux et plus facile pour l'élevage (Ruttner, 1988).

Une seule étude de la diversité génétique des abeilles portant sur un nombre restreint d'individus a été réalisée sur les populations de la zone Océan Indien (Franck et al. 2001). Toutefois, les analyses réalisées sur la sous espèce *A. m. unicolor* à Madagascar ont été succinctes et ne permettent pas d'évaluer la diversité génétique au sein des populations d'abeille malgache.

A Madagascar, les activités humaines pourraient impacter fortement la survie de cette sous-espèce, telle le risque d'intoxication par les traitements anti-acridiens (FAO, 2014) ou la perte d'habitat due à l'abus de déforestation (50 000 Ha/ an, Conservation internationale, 2005). A ces menaces se sont ajoutées des menaces plus récentes. En 2004, l'abeille malgache a été reconnue exempte de maladies graves (Cite, 2004). Depuis 2010, divers bio-agresseurs sont connus à Madagascar. Parmi eux, le parasite *V. destructor*, véritable fléau de l'apiculture mondiale, est arrivé à Madagascar (OIE, Fév- 2010). *V. destructor* est originaire d'Asie du Sud-Ouest (Oudemans, 1904). Au gré de la transhumance et des échanges commerciaux, cet acarien nomade a pu franchir les barrières naturelles, et infecter les sous-espèces d'*A. mellifera* en 1958 (Mikawa, 1986), depuis, il s'est répandu rapidement et est trouvé presque partout dans le monde (à l'exception de l'Afrique centrale et Australie. Ce parasite touche non seulement les colonies domestiques mais également les colonies sauvages en provoquant des dégâts importants (Kraus and Page, 1995; Neumann and Carreck, 2010).

La varroase semble affecter plus fortement les sous-espèces européennes (Büchler et al., 2010) et les colonies américaines (Rinderer et al., 2010), la majorité des colonies s'effondrent quelques années après la première infestation si le parasite n'est pas régulé par l'apiculteur (Locke et al., 2012).

Malgré l'intensification des échanges de colonies d'*A. mellifera* entre les pays, la diversité génétique des populations de *V. destructor* semble rester très faible (Solignac et al., 2003).

Partout, dans les pays où le *V. destructor* est présent, les mesures prises pour contrôler ses populations sont diverses. Certains apiculteurs détruisent les couvains mâles ou éliminent les colonies très sensibles. Le recours aux acaricides devient incontournable à partir de seuil critique, mais leur utilisation peut remettre en cause la santé de l'abeille et la qualité du miel (Lodesani et al., 1992). Par ailleurs, les acariens peuvent montrer une résistance à ces produits après plusieurs utilisations (Currie and Gatien, 2006). Le recours à d'autres méthodes de

contrôle du *V. destructor* s'avère indispensable. Dans les pays en voie de développement comme Madagascar, la sélection de souches tolérantes au *V. destructor* est une alternative intéressante pour faire face au parasite.

La tolérance naturelle de certaines sous espèces (de lignée Africaine et ses hybrides notamment (Calderón et al., 2010) pourrait être d'origine multifactorielle. Un comportement hygiénique plus efficace (Rothenbuhler, 1964; Spivak and Reuter, 2001), un comportement d'épouillage plus dynamique (Boecking and Spivak, 1999), la diminution de la fertilité de l'acarien (Martin et al., 1997) ainsi que la réduction de la longueur de la période de post-operculation (Büchler and Drescher, 1990) ont été montrés comme des facteurs pouvant conférer une plus forte tolérance vis-à-vis du parasite.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Biogéographie de Madagascar

- Présentation générale de Madagascar

Madagascar se trouve dans la zone tropicale entre 12°S et 25°30S, située au Sud-Ouest de l'océan Indien et séparée de l'Afrique de l'Est par le canal de Mozambique. Elle a été séparée de l'Afrique au mésozoïque il y a environ 165 millions d'année et de la péninsule Indienne depuis 88 millions d'année (Storey et al., 1995).

Cette île continentale d'une superficie de 592.000 km², est classée au quatrième rang des plus grandes îles après le Groenland, la Nouvelle Guinée et Bornéo. Elle s'étend du Nord au Sud sur 1580 km et de l'Est à l'Ouest sur environ 500 km. Des groupes d'îlots se trouvent au Nord-Ouest (Nosy Be, Nosy Komba et Nosy Tany kely) et à l'Est (île Sainte Marie).

Du point de vue administratif, Madagascar est divisée en 22 régions (Fig.1), 119 districts, 1 579 communes, 17 485 Fokontany ou quartiers (INSTAT/Mars 2010) et compte environ 19 millions d'habitants.

Le relief permet de diviser l'île en basses plaines côtières et les Hauts Plateaux centraux (Fig.2). Les Hauts Plateaux comprennent l'intérieur de l'île au-dessus de 700 m avec 3 grands massifs montagneux : l'Ankaratra au Sud de Tananarive culminant à 2 643 m d'altitude, l'Andringitra dans le centre Sud à 2 658 m et Tsaratanana au Nord à 2 876 m.

- Conditions climatiques

Le climat est caractérisé par deux types de saisons bien marquées. L'hiver austral (saison la plus sèche) s'étend du mois d'Avril jusqu'en Octobre. L'été austral (saison des pluies) dure de Novembre à Mars. Un vent de mousson souffle du Nord-Ouest, les précipitations sont très abondantes surtout sur la côte Est. Les cyclones ont lieu entre Janvier et Mars et provoquent une perturbation générale du temps avec des pluies abondantes, particulièrement dans les zones côtières. Les cyclones se forment dans la zone de convergence inter-tropicale, soit dans l'Océan Indien, soit dans le canal de Mozambique. Les pluies massives, le vent violent et l'inondation causent des dégâts souvent considérables, voire dramatiques pour les régions côtières.

Le climat varie également en fonction des zones géographiques ; les Hauts Plateaux centrales ont de climat « tropical d'altitude ». L'Est de l'île présente un climat « sub- équatorial ». Le Nord et le Nord- Ouest présentent un climat de type « équatorial ».

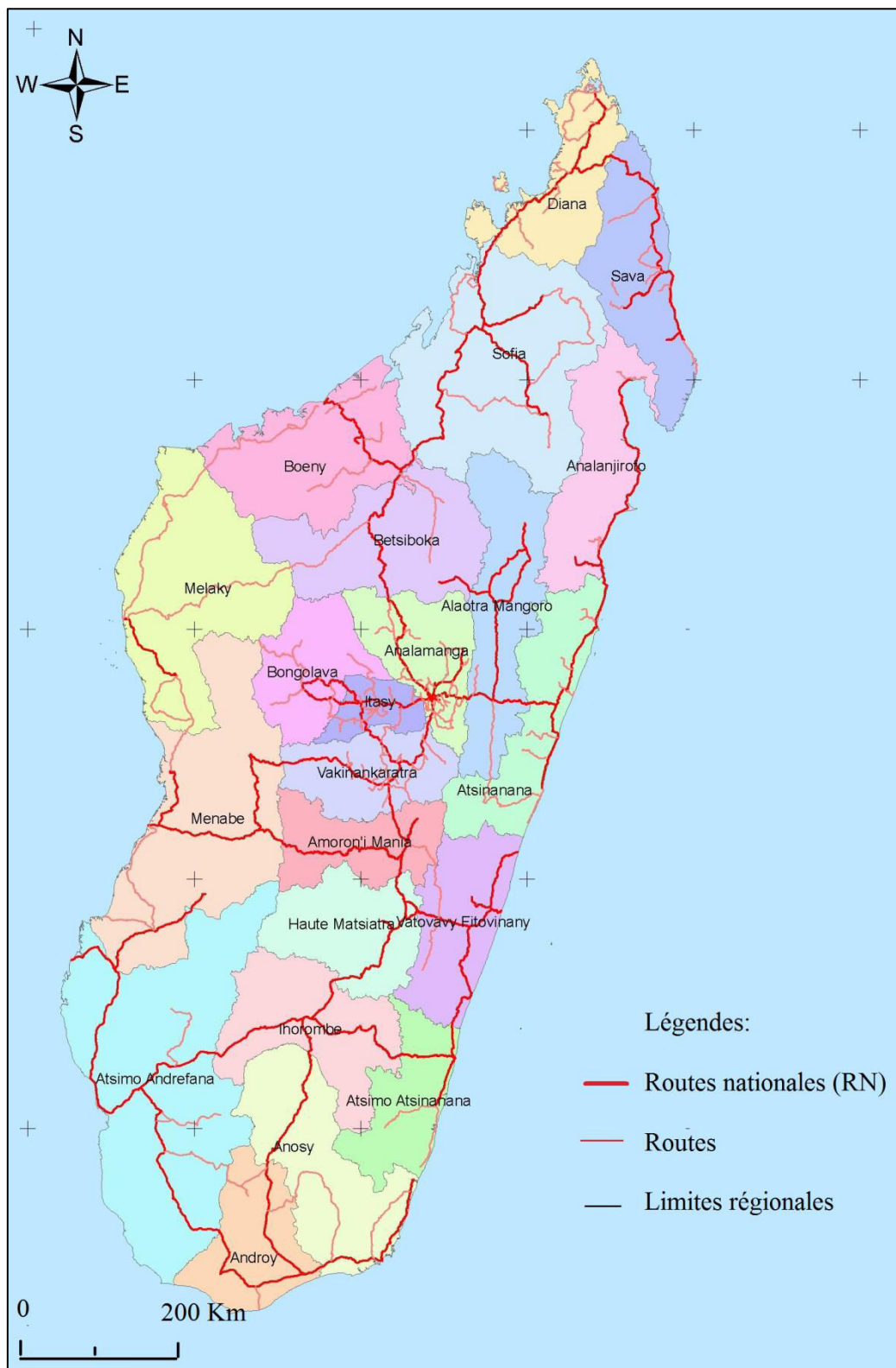


Figure 1. Découpage administratif en 22 régions et axe routiers principaux à Madagascar. Carte créé sous Arc Map 10, source: données SRI de Madagascar, édition 2010

Le climat « tropical chaud » durant la saison sèche marque la côte Ouest. Le Sud-Ouest a un climat « tropical sec », c'est la région la plus aride de Madagascar où la période de sécheresse peut durer plus de 10 mois (Koechlin, 1972).

A Madagascar, la température atteint un minimum au mois de Juillet- Août et le maximum en Janvier- Février. En général, elle tourne autour de 25°C sur les Hauts Plateaux, mais peut descendre vers 10°C pendant l'hiver austral, voire 0°C à Antsirabe (région Vakinankaratra). Sur les côtes, la température moyenne est de 30°C, elle peut atteindre 35 °C pendant la saison chaude et ne descend que rarement en dessous de 20°C en hiver.

Madagascar reçoit en moyenne 1 513 mm de précipitations par an. Il existe de fortes disparités entre les régions en matière de pluviométrie, certaines régions comme le Sud souffrent de pénuries d'eau. Sur la côte Est et les Hauts Plateaux, la pluviométrie atteint 1500 m/an, tandis que, seulement 800 m/an sont observés sur la côte Ouest et 400 m/an dans le Sud. La région Est (région Antsinanana) est la plus arrosée de l'île et les pluies sont constantes toute l'année avec des pointes en été. L'alizé du sud, d'une épaisseur entre 2 000 à 4 000 m, est le vent prédominant à Madagascar, son courant très humide apporte de fortes précipitations (2 à 4 m/an) sur la côte orientale. La pluviosité diminue vers l'Ouest (région Menabe) et le Sud-Ouest (région Atsimo Atsinanana), jusqu'à la région semi-aride du Sud (Tuléar) et de l'extrême Sud.

La grande diversité des conditions climatiques et milieux naturels, associée à l'isolation de l'île durant 165 M d'année ont favorisé la mise en place d'une flore extrêmement diversifiée (Ganzhorn et al., 2001).

-Flores de Madagascar

A ce jour, Madagascar fait partie des zones à très haute biodiversité et figure parmi le 5 premiers « hot spot » (25 pays, Myers et al., 2000). Elle comporte 80% des flores endémiques (Ganzhorn et al., 2001). Les formations forestières occupent un espace de 12,5 millions d'hectare soit 21% de la superficie totale et on compte à Madagascar près de 10 000 espèces de plantes vasculaires endémiques (plante à l'usage médicinal et mellifère, (Gautier and Goodman, 2003) mais l'usage extensif des forêts met la biodiversité en péril (Kull, 2002), Fig. 3). Toutefois, à peine 10% du couvert végétal original persiste toujours (Ganzhorn et al., 2001). Les Hauts Plateaux deviennent un domaine de savanes et de pseudo-steppe. La forêt dense ombrophile orientale a été remplacée par des formations herbacées et des végétations

secondaires. Les espèces résistantes aux feux de brousse dominent à l'ouest. Le sud semi-désertique (Tuléar, région Atsimo Andrefana) est une zone de bush xérophile (Fig.3).

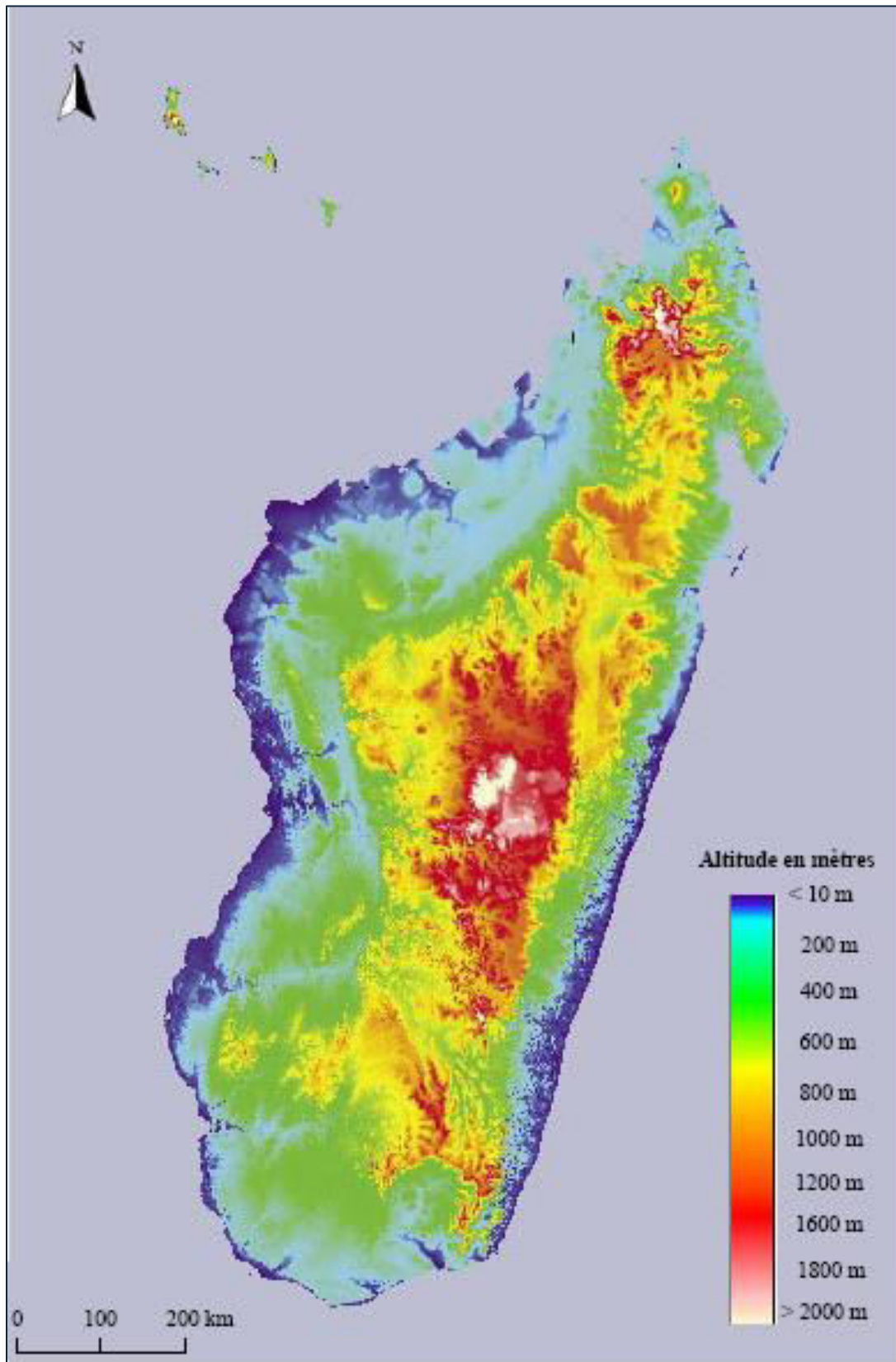


Figure 2. Carte de relief de Madagascar montrant les différentes altitudes. Source : GTOPO30/ Global DEM de Clatk Labs / Idrisis Project.

Nous détaillons ci-dessous les flores mellifères malgaches par divisions géographiques, les données sont issues de la thèse de Ralalaharisoa-Ramamonjisoa (1996).

Sur les Hauts Plateaux, l'eucalyptus de la famille des Myrtacées est la plante mellifère dominante; c'est une espèce exotique qui pourrait avoir été introduite à Madagascar peu après l'occupation française. *Eucalyptus robusta* est l'espèce la plus répandue et représente 80% dans la formation de boisement actuel, la période de floraison commence le mois d'Avril jusqu'en Octobre. Le mimosa, *Acacia pervillei* (Miller (Leguminosae s'y ajoute mais sa floraison n'est que de très courte durée (Juillet-Septembre)). D'autres plantes arbustives indigènes sont aussi connues dans les zones environnantes des Haut Plateaux centraux, telles *Aphloia theaeformi* (Flacourtiaceae), *Philippia sp.* (Ericaceae), *Psiadia altissima* (Asteraceae) qui fleurissent de Septembre à Octobre.

Le Sud-Est des Hauts Plateaux est dominé par *Dombeya sp.* (Sterculiaceae), *Ochrocarpus madagascariensis* (Clusiaceae), *Weinmannia sp.* (Cunoniaceae), *Zanthoxylum sp.* (Rutaceae), des arbres et arbustes endémiques de la forêt d'altitude.

Sur la côte Ouest, des analyses polliniques montrent l'importance des différentes espèces de *Dalbergia* (*D. trichocarpa*, *D. pervillei* (Fabaceae)) comme plantes mellifères auxquelles s'ajoutent d'innombrables espèces de légumineuses: *Albizia spp.*, *Acacia spp.*, *Caesalpinia spp.* L.. Des formations secondaires à *Ziziphus spp.* Miller (Rhamnaceae) principalement et des mangroves (*Avicennia marina* L. (Verbenaceae)) constituent des sources potentielles de nectar et pollen.

La côte Est est dominée par des forêts indigènes, et les cultures de rente. Malgré la déforestation croissante, elle possède des zones relativement denses en forêt indigènes. Les essences mellifères forestières principales appartiennent aux Euphorbiaceae (ex : *Croton goulnelotti*), Cunoniaceae (*Weinmannia sp.*) et Guttiferae (*Harunga madagascariensis*), ces arbres fleurissent d'octobre à décembre. Les cultures de rentes constituent d'excellentes plantes mellifères comme les caféiers, (*Coffea robusta* L.), les girofliers, l'Ylang-Ylang (*Cananga odorata*), les cacaoyers (*Theobroma cacao* L), les vanilliers (*Vanilla planifolia* Jakson), le litchi (*Nephelium litchi* ou *Litchi javensis* Leenh). Des centaines d'hectares de Niaouli (*Melaleuca leucadendron*, *Melaleuca quinquenervia* (Myrtaceae)) a été plantée dans la région Est depuis 1990 pour le reboisement (Ramanoelina et al., 2003).

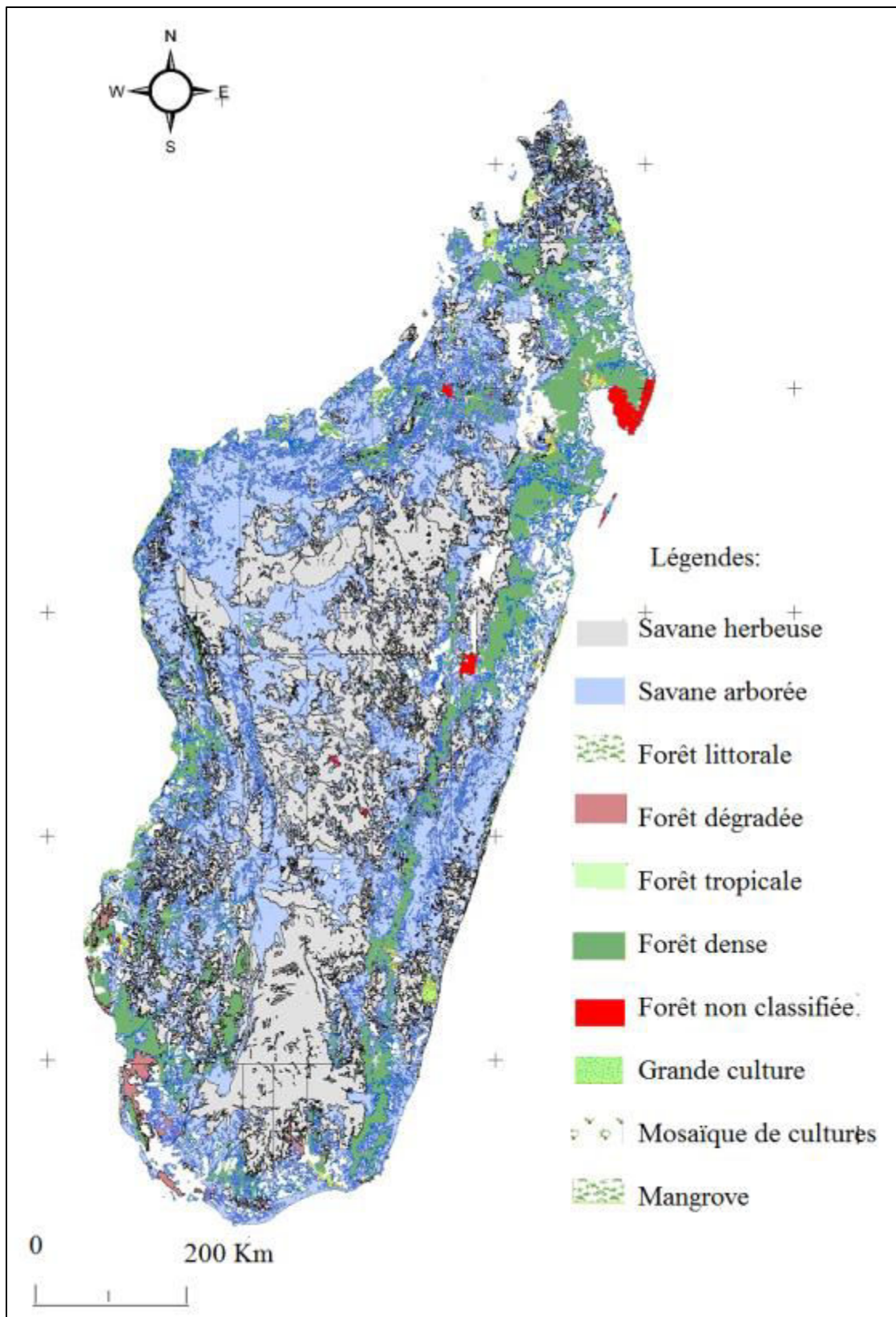


Figure 3. Distribution des différents habitats de Madagascar. Créé sous Arc Map 10. Source: Géologie de Madagascar.

Au Nord, la plante mellifère dominante est surtout le ylang ylang (F. Annonacea , (*Cananga odorata*)), il fleurit tout le long de l'année. Des forêts denses sèches appartenant à la série de *Dalbergia*, *Commiphora* et *Hildegardia* avec prédominance des Euphorbiaceae et Leguminosae sont aussi connus.

La région Sud est très pauvre en flore, elle est surtout caractérisée par des arbustes et des fourrés épineux comme *Pachypodium sp.* (Apocynaceae), de légumineuse comme *Grewia sp.* (Proteaceae), *Gagnebina commersoniana* (Fabaceae), et *d'Helmiopsiella madagascariensis* (Sterculiaceae). Le tamarinier (*Tamarindus indica*, (Cesalpinoideae)) est aussi très répandu.

Le transfert du pollen des étamines vers le stigmate est une étape fondamentale de la reproduction des phanérogames, il est généralement effectué par des insectes pollinisateurs, en particulier les abeilles mellifères.

II- Modèle biologique 1 : l'abeille *A. mellifera*

II.1-Systématique

Les Apidae appartiennent à l'ordre des hyménoptères. Cette famille représente l'immense majorité des insectes pollinisateurs. La famille des Apidae comprend quatre grandes sous-familles: Bombinae, Euglossinae, Meliponinae, et Apinae (Michener, 1965). Les Bombinae (les bourdons) forment des petites colonies annuelles fondées par une seule femelle. Les Euglossinae ou abeilles des orchidées sont solitaires, tandis que les Meliponinae (les Melipones ou les abeilles sans dard) et les Apinae (les abeilles domestiques) ont une vie communautaire et les sociétés élaborées forment des colonies pérennes (O'Toole and Raw, 1991).

Le genre *Apis* est le seul de la sous-famille des Apinae et est composé de trois sous-genres (*Micrapis*, *Megapis*, et *Apis* proprement dit, Fig. 4). Il est divisé en une dizaine d'espèces, dont *A. mellifera* (Linnaeus, 1758), l'abeille naine *A. florea* (Fabricius, 1787), l'abeille géante *A. dorsata* (Fabricius, 1793) et l'abeille asiatique *A. cerana* (Fabricius, 1793). Les autres espèces sont répertoriées dans le Sud-Est asiatique telle que : *A. koschevnikovi* (Enderlein, 1906), *A. nigrocincta* (Smith, 1861) et *A. nuluensis* (Tingek, 1996), *A. andreniformis* (Smith, 1858), une autre abeille géante, *A. laboriosa* (Smith 1871).

Les espèces *A. mellifera* et *A. cerana*, les seules domesticables ont divergées il y a environ 8 millions d'années (Ruttner, 1988). Ces deux espèces sont génétiquement incompatibles (non

interfécondes) et présentent de nombreuses différences surtout quant à leurs réactions face aux parasites et pathogènes. *Apis cerana* est composée de 6 sous-espèces (Radloff et al., 2010) toutes distribuées dans le Sud-Est asiatique.

Tableau 1: Liste des sous espèces d'*A. mellifera*, chacune des lignées évolutives s'est diversifiée en plusieurs sous espèces (modifiée Ruttner, 1988).

Aires Géographiques		Sous espèces d' <i>A. mellifera</i>
Asie centrale	<i>A. mellifera</i>	<i>Pomonella</i> (Sheppard and Meixner, 2003)
		<i>anatoliaca</i> (Maa, 1953)
		<i>adami</i> (Ruttner, 1975)
		<i>cypria</i> (Pollmann, 1879)
Proche- orient	<i>A. mellifera</i>	<i>syriaca</i> (Buttel -Reepen, 1906)
		<i>meda</i> (Skorikov, 1929)
		<i>caucasica</i> (Gorbatchev, 1916)
		<i>armeniaca</i> (Skorikov, 1929)
Afrique tropicale	<i>A. mellifera</i>	<i>lamarckii</i> (Cockerell, 1906)
		<i>yemenitica</i> (Ruttner, 1975)
		<i>litorea</i> (Smith, 1961)
		<i>scutellata</i> (Lepeletier, 1836)
		<i>adansonii</i> (Latreille, 1804)
		<i>monticola</i> (Smith, 1961)
		<i>capensis</i> (Escholtz, 1821)
		<i>unicolor</i> (Latreille, 1804)
Afrique du nord-est	<i>A. mellifera</i>	<i>major</i> (Ruttner, 1978)
		<i>sahariensis</i> (Baldensperger, 1924)
		<i>intermissa</i> (Buttel-Reepen, 1906)
Europe Méditerranée occidentale et centrale	<i>A. mellifera</i>	<i>simensis</i> (Meixner, 2011)
		<i>iberiensis</i> (Goetze, 1964)
		<i>mellifera</i> (Lineus, 1758)
		<i>sicula</i> (Montagano, 1911)
		<i>ligustica</i> (Spinola, 1806)
		<i>cecropia</i> (Kiesenwetter, 1860)
		<i>macedonica</i> (Ruttner, 1987)
		<i>carnica</i> (Pollmann, 1879)
		<i>ruttneri</i> (Sheppard, 1997)
		<i>sypria</i> (Pollmann, 1979)
		<i>remipes</i> (Gerstacker, 1862)

Des études biométriques et génétiques ont permis de classer les sous-espèces d'*A. mellifera* en quatre lignées évolutives : la lignée A endémique d'Afrique, la lignée M à l'Ouest de l'Europe (de l'Espagne à la Scandinavie), la lignée C au centre et au Nord de l'Europe, la lignée O en Turquie et dans le Caucase (Ruttner et al., 1978 ; Ruttner, 1988). L'utilisation de divers marqueurs moléculaires a permis de confirmer cette classification (Franck et al., 2000; Garnery et al., 1992; Whitfield et al., 2006, Han et al., 2012). Plus tard, Alburaki et ses collègues (2013) décrivaient une sous lignée de A dite Z.

Un total de 29 sous-espèces de *A. mellifera* (Tableau 1) ont été recensées sur la base de critères morphologiques, génétiques, écologiques et biologiques (Meixner et al., 2011; Meixner et al., 2013; Ruttner, 1988; Sheppard and Meixner, 2003).

Les sous espèces sont inter- fécondes entre elles. Leur croisement aboutit à une naissance d'un hybride, par exemple, l'abeille dite « africanisée », dérive du croisement d'*A. m. scutellata* avec des abeilles européennes. Ces abeilles africanisées (surnommées 'abeilles tueuses') se sont répandues à toutes les zones tropicales de l'Amérique du Sud et centrale, au Brésil, aux Etats-Unis et Argentine (Kerr et al., 1982).

Une sous-espèce peut être divisée en écotype. Lorsqu'une population d'abeille évolue différemment dans un biotope précis, il s'agit d'un écotype; un écotype quand il se déplace d'un biotope à un autre garde son particularisme.

II.2- Castes d'abeille

Les abeilles sont des insectes eusociaux, caractérisées par le chevauchement des générations, la coopération dans l'entretien des immatures et la division de travail reproducteur (Wilson, 1971). Une colonie compte entre 20.000 et 40.000 abeilles (Page and Peng, 2001) et s'organise autour de deux castes distinctes : les reproducteurs (reines et mâles ou faux bourdons), des ouvrières (Fig. 5). La fonction des mâles se limite à la fécondation de la reine, ils meurent généralement après l'accouplement (Paxton, 2005).

Les castes sont distinguées morphologiquement, la reine se reconnaît par l'abdomen développé et le thorax plus volumineux que les ouvrières. Son apparence externe varie en fonction de son âge. Le mâle plus grand que les ouvrières est dépourvu de dard, de plaque cirière et de système adapté à la récolte de pollen tandis que l'appareil vulnérant porte de l'aiguillon ou dard et d'un sac à venin chez les ouvrières.

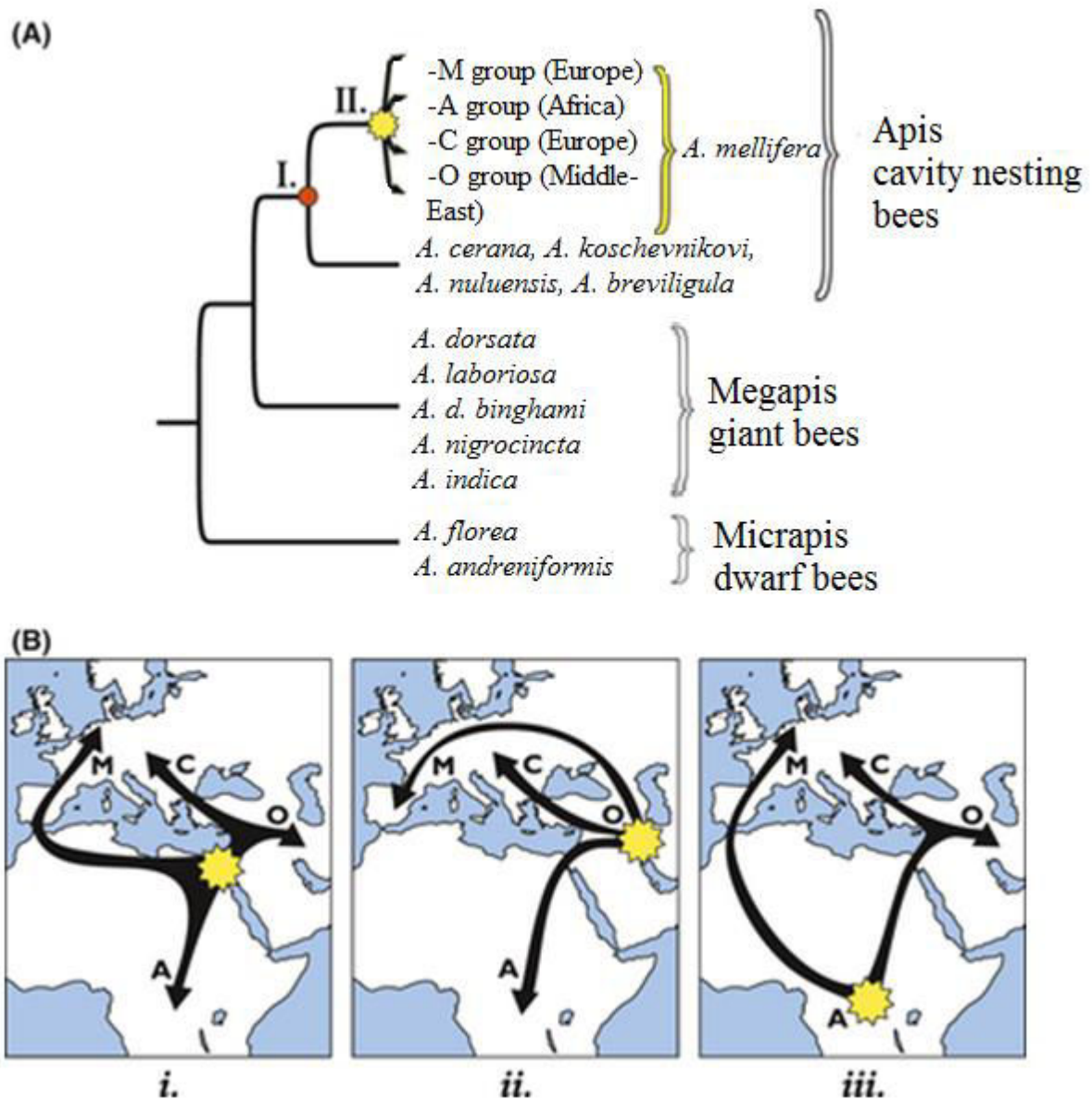


Figure 4. Evolution d'*A. mellifera* selon Han et al. (2012). (A) Phylogénie représentant les 12 espèces du genre *Apis*. Le nœud I représente la séparation entre *A. mellifera* et d'autres espèces d'abeilles. Le nœud II représente le plus récent ancêtre commun des sous-espèces existantes d'*A. mellifera*. (B) Trois hypothèses ont été proposées pour expliquer la diversification de l'espèce et l'origine des différentes lignées d'*A. mellifera*. (i) Une expansion à partir du Moyen-Orient, impliquant la colonisation de l'Europe par deux voies, l'une orientale et l'autre occidentale (Ruttner, 1978). (ii) Une expansion à partir du Moyen-Orient, qui n'impliquait pas la route de colonisation de l'Ouest vers l'Europe (Garnery et al., 1992). (iii) Une origine africaine a été proposée par Wilson (1971) et une expansion de l'Afrique par le biais à la fois de l'Est vers l'Ouest (Whitfield et al., 2006). L'étoile jaune correspond au nœud II de la figure (A).

Les ouvrières généralement stériles accomplissent tous les travaux de la ruche. (Seeley, 1983) regroupe les travaux de la ruche en 4 catégories de base: i) nettoyage des cellules, désoperculation, ii) soins de la reine et du couvain, iii) nettoyage et manipulation de la nourriture, iv) des travaux à l'extérieur comme la ventilation, le gardiennage, et la recherche de la nourriture. La distribution des différentes tâches à l'intérieur de la ruche se fait en fonction de la démographie (polythéisme d'âge, Seeley, 1983). Les jeunes ouvrières occupent des simples travaux à l'intérieur de la ruche, les plus âgées sont des butineuses (Seeley, 1983). Les ouvrières passent à ces différentes phases comportementales après 4 à 7 j de leur naissance ((Winston, 1987).

Cependant, la répartition des tâches au sein des groupes d'abeilles de même âge est sous prédisposition génétique. La distribution des génotypes entre les gardiennes et les nettoyeuses et l'ensemble des ouvrières semble inégale. Calderone et ses collègues (1989) ont démontré qu'il existe une différence génétique, en terme de proportions des diverses fratries, entre les butineuses qui récoltent le pollen et celles qui préfèrent le nectar. Frumhoff and Baker (1988) ont mis en évidence le déterminisme génétique du comportement de soin et de nourrissage des congénères.

En outre, la physiologie et le comportement des ouvrières sont sous l'influence de la phéromone sécrétée par la reine (Free, 1987; Williams et al., 1982).

II.3-Cycle de développement de l'abeille

L'abeille présente un cycle de développement holométabole. L'ontogénèse est découpée en 4 stades de développement, intercalés par 7 mues. Les immatures regroupent les œufs, les couvains et les nymphes et leurs développement se font au niveau des cellules operculées. Les œufs éclosent 3 j après la ponte et chaque œuf donne une larve de premier stade (L1). La larve L1 se trouve au fond d'une cellule et baigne dans la gelée royale, elle est nourrie par les nourrices par trophallaxie (Brouwers et al., 1987). La larve de la reine est particulière, élevée à partir de gelée royale (Beetsma, 1979; Wilde and Beetsma, 1982). La L1 subit 5 mues successives et devient une nymphe immobile. Le stage près- imaginal dure 16 à 24 j selon la caste (Martin, 1994). La mue imaginale transforme la nymphe en imago naissant.

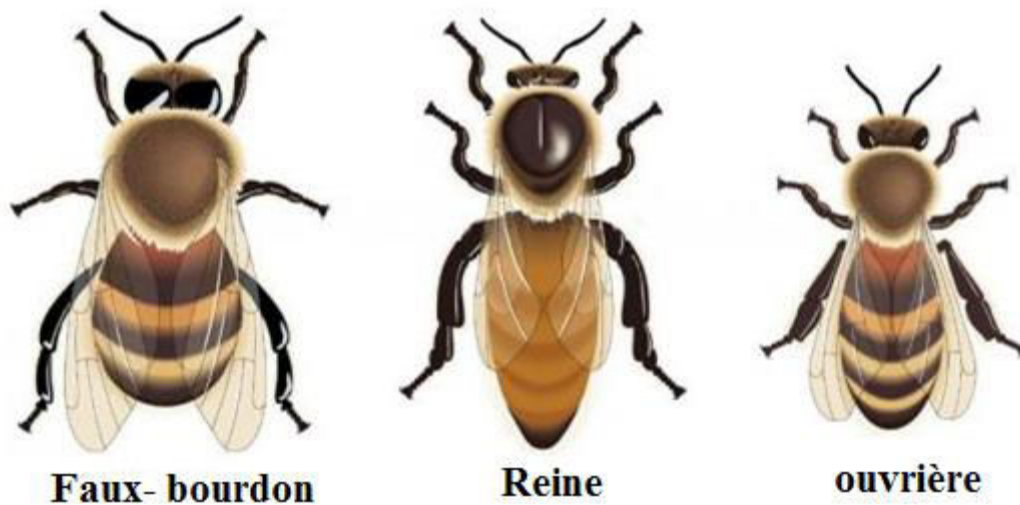


Figure 5. Schéma des 3 castes de l'abeille

Les castes adultes se différencient selon leur durée de vie. Le mâle atteint rarement plus de 60 jours (Page and Peng, 2001), il est chassé par les ouvrières au cours de la mauvaise saison. L'ouvrière, en général vit de 15 à 70 j en été, la forte activité diminue son espérance de vie mais elle peut vivre 4 mois en hiver (Page and Peng, 2001). La reine peut atteindre jusqu'à 3 à 8 ans (Bozina, 1961; Seeley, 1978).

Pour *A. m. unicolor*, abeille tropicale, le cycle biologique annuel sommaire de l'abeille traduit une assez longue période d'activités de la colonie allant de Mars à fin Novembre pendant laquelle des fleurs à butiner sont présentes. A partir du mois de Décembre, les activités des abeilles s'affaiblissent et deviennent presque nulles en Janvier et Février, la production de couvain est en mois de Février- Décembre, la forte activité se situe entre les mois de Mars et Novembre (cas des colonies d'abeille de Mandraka (rucher des Hauts Plateaux), Projet Fades, 2002).

II.4-Reproduction de l'abeille

Les œufs pondus par la reine peuvent être fécondés ou non fécondés. Les œufs non fécondés, haploïdes, hémi-zygotes à ce locus du CSD¹, se développent en mâles (n chromosomes). Les œufs fécondés, diploïdes et hétérozygotes au locus du CSD donnent des femelles ($2n$ chromosomes) (Cook, 1993).

¹ CSD : Locus Complementary sex Determination

Des mâles diploïdes, homozygotes au locus CSD, peuvent apparaître en cas d'une forte consanguinité (Cook, 1993). Ces mâles diploïdes sont généralement stériles et dépourvus de spermatozoïdes (Crozier and Page, 1985). Leur production est souvent considérée comme un fardeau génétique pour la colonie (Heimpel and de Boer, 2008) du fait de leur faible viabilité (Petters and Mettus, 1980) et de leur stérilité (El Agoze et al., 1994).

La colonie d'abeille est qualifiée de monogyne, c'est à dire qu'elle ne contient qu'une seule reine reproductrice ; l'accouplement commence peu de jours après l'émergence de la jeune reine (« gyne »), elle est inséminée par un grand nombre de mâles au cours d'un unique vol nuptial. En moyenne 8 à 27 mâles différents (variable selon les sous-espèces) peuvent s'accoupler avec une seule et même reine (Palmer and Oldroyd, 2000). Ce système d'accouplement multiple ou polyandrie permet à la reine d'accumuler le sperme pour la fécondation (Cole, 1983). Elle peut recevoir environ 6 millions de spermatozoïde dans ses oviductes dont environ 5 millions sont transportés vers la spermathèque dans une période de 40 h (Woyke, 1955). Ces spermatozoïdes serviront pour la fécondation des œufs durant 1 à 2 ans. Les spermatozoïdes sont accumulés dans la spermathèque.

II.5-Apiculture à Madagascar

A Madagascar, l'agriculture contribue pour 38,4 % du PIB² et représente 80 % des exportations (Instat, 1997). Environ 70% des malgaches sont à la fois ruraux et agriculteurs (Instat, 2003). L'apiculture, par la pollinisation effectuée par les abeilles, revêt un rôle indirect sur l'agriculture malgache.

Depuis 1963, une division de l'apiculture a été créée (Décret n° 63-283 du 22 mai 1963) dans le but de vulgariser les techniques apicoles modernes et de contrôler le miel et les abeilles. Depuis, plusieurs projets de relance de la filière (ex : Centres de Traitements de Produits d'Apiculture (CTPA), PROSPERER, projet financé par la Food and Agriculture Organization (FAO), ...) ont investi dans l'achat de matériel apicole (ruches à cadres, outils, miellerie), la formation de paysan et la mise en place de nouvelles techniques d'élevage.

Au moins trois ministères (MAEP, le MECI et le DSV) et environ une dizaine d'organismes privés (PPRR, Cite, ...) sont impliqués dans le développement de la filière apicole. Plusieurs associations (FENAM, FENAPI, ...) regroupant des apiculteurs se sont également formées par district ou région administrative. D'après le recensement national datant de 1988 (Statistique Elevage), on compte 14 455 ruches dont 12 741 ruches traditionnelles et 1 714

² PIB: Produit Intérieur Brut

ruches à cadres appartenant à 5 839 apiculteurs affiliés dans 132 groupements. Faute de gestion efficace, cet effectif n'est pas à jour. A ce jour, les recensements sont réalisés localement au niveau des apiculteurs membres des associations au sein des régions.

A Madagascar, le miel est largement utilisé dans les ménages (comme compléments alimentaires et traitements de certaines maladies), en industrie cosmétique, en confiserie et pâtisserie. Outre son utilisation culinaire et médicinale, le miel, principalement, et la cire constituent une source de revenus pour les apiculteurs. La production de miel a été la plus élevée en 1929 avec 38 000 tonnes de miel liquide dont 25 000 tonnes ont été exportés (Statistique Elevage). La production a fortement chuté depuis, en partie à cause de l'embargo européen de 1997 sur les denrées alimentaires malgaches d'origine animale vers l'Union Européenne. Toutefois, Madagascar exporte du miel vers les pays voisins (Comores, Maurice) mais aussi en Asie (Instat, 2010). Au niveau national, une forte demande est observée.



Ruche de type traditionnel (tronc d'arbre creusé)



Ruche de type artisanal amélioré (en bois)



Ruche moderne de type Dadant

Figure 6. Les différents types de ruche à Madagascar (photos : H. Rosolofoarivao)

Bien que l'apiculture est appliquée pour toute l'île, seulement trois régions sont les grandes producteurs de miel, ainsi la flore variée de chaque région permet une diversification des produits: les Hauts Plateaux produisent principalement des miels d'eucalyptus, miels de mille fleurs et miels d'arbres fruitiers "tempérés". L'Ouest et le Nord-Ouest se spécifient davantage dans la production de miel d'Acacia, de jujube et de palissandre ; tandis que l'Est et le Nord-Est sont réputés pour leurs miels de caféiers, avocatiers, orangers, litchi, baies rose et diverses essences forestières.

L'apiculture reste une activité rudimentaire, environ 92 % des apiculteurs pratiquent l'élevage de type traditionnel (Ministère élevage, 2004). La ruche est un simple compartiment fait de poterie, de vieux tronc d'arbre creusé, de récipients ou de caisses (Fig.5). L'apiculteur possède une ou deux colonies. Certaines ruches sont installées près des habitations humaines; cependant quand la provision de ressource aux alentours de la ruche est insuffisante, l'apiculteur peut déplacer ses colonies vers la forêt environnante. La plupart des apiculteurs capturent des essaims d'abeilles de la forêt par piégeage pour démarrer l'élevage. La majorité des apiculteurs n'ouvrent leurs ruches qu'en période de récolte (au maximum 2 récoltes /an). Le rendement en miel fournit par une ruche traditionnelle est estimé de 5 à 7 L/ ruche/ récolte (Cite, 2009).

L'api- cueillette est encore répandue dans certaines régions, elle consiste à chasser des essaims sauvages et en extraire directement le miel, le volume du miel récolté est très faible de produit, le miel est surtout destiné pour la consommation; cette pratique est classée dans l'apiculture traditionnelle.

La facilité des abeilles tropicales à désertier leur nid (Ruttner, 1988) décourage les apiculteurs à adopter l'apiculture dite « améliorée » ou « moderne » (Fig.5). L'apiculture dite « améliorée » est pratiquée par 5 % des apiculteurs (Ministère Elevage, 2004). Un apiculteur possède en moyenne de 10 à 12 ruches simples artisanales mais à cadres. Bien qu'il s'agisse souvent d'une activité annexe, cette pratique fournit une source de revenus non négligeable pour les paysans; une ruche à cadre produisant 10 à 15 L par récolte.

L'apiculture de type « moderne » est très rare, et n'est pratiquée que par 3 % des apiculteurs (Ministère élevage, 2004). Les ruches les plus utilisées sont de type Dadant ou Langstroth. La vulgarisation des techniques modernes et l'encadrement des apiculteurs sont privilégiés. La production est associée à la vente et à l'exportation. Les conditions d'élevage respectent les mesures d'hygiène (suivi et récolte périodique) et la norme sur la dimension des ruches. Afin d'éviter la carence alimentaire, les ruches sont placées à proximité des plantes mellifères (ex : verger de litchi ou d'autres arbres fruitiers, en pleine forêt protégée, ...). Ces élevages modernes sont souvent gérés par des étrangers (ex : miellerie de Jocelyne à Diego- Suarez, miellerie de QMM à Fort Dauphin) ou par des associations d'apiculteurs (FENAM, CRAM, ...FENAM, 2009), et associés à une miellerie assurant la récolte et le conditionnement du miel.

En 2004, *A. m. unicolor* était déclarée indemne de maladies graves (Cite, 2004). Malgré les différents décrets (n°92-285 du 26 Fév-1992, n° 99-020 du 20 Jan-1999) fixant les mesures préventives de lutte contre les maladies des abeilles à Madagascar (interdiction de l'importation des animaux vivants, présence de personnel de la DSV pour la surveillance épidémiologique, ...), la varroase s'est abattue sur le cheptel apicole malgache, officiellement déclarée en 2010 (OIE, Fév- 2010). A ce jour, aucune information fiable n'est connue sur les modalités d'introduction de cet ectoparasite à Madagascar.

Plusieurs arthropodes (invasifs ou indigènes) sont connus comme ennemies de l'abeille, parmi le *V. destructor*.

III-Modèle biologique 2 : l'acarien *V. destructor*

III.1-Taxonomie et historique d'invasion

Le genre *Varroa* appartient à la classe Arachnoidea, sous-classe Acari, super- ordre Anactinotrichida, ordre Gamasida et famille Varroidae (Krantz and Walter, 2009; Lecointre and Le Guyader, 2001).

La famille Varroidae ne comporte qu'un seul genre, *Varroa* qui regroupe cinq espèces : *V. underwoodi* décrit d'*A. cerana* au Népal, *V. rindereri* décrit de *A. koschevnikovi* à Bornéo, *V. jacobsoni* ectoparasite naturel d'*A. cerana* à Java et une large répartition en Asie (Oudemans, 1904), *V. destructor* (Anderson and Trueman, 2000) parasite d'*A. cerana* son hôte d'origine et de *A. mellifera* son nouvel hôte.

Varroa jacobsoni et *V. destructor* sont des espèces jumelles caractérisées par de péritreme court et enroulé en boucles serrés, de soies de l'endopode moins nombreuses ainsi que par la présence d'une soie sur le trochanter palpal (de Guzman and Rinderer, 1999). La taille est de 1063,0µm/26,4µm pour *V. jacobsoni* et 1506,8µm/36,0µm pour *V. destructor*.

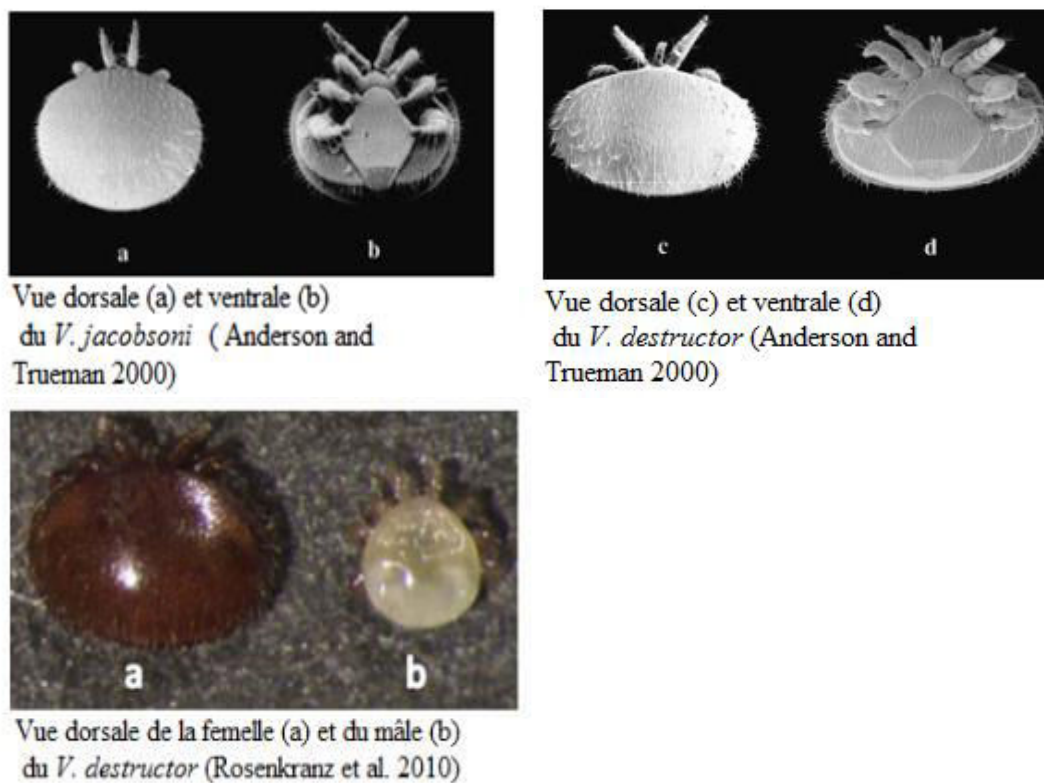


Figure 7. Morphologie des 2 espèces du genre *Varroa*.

Les séquences des gènes mitochondriaux mtDNA COI de *V. jacobsoni* diffèrent de 6,7% par rapport à celles de *V. destructor* (GenBank database ; *V. jacobsoni* : AF106902-AF106910 ; *V. destructor* : AF106897-AF106901).

Varroa jacobsoni peut parasiter d'autres espèces telles *A. koschevnikovi* à Bornéo, *A. nigrocincta* d'Indonesie, *A. nuluens* du Borneo, il parasite l'abeille *A. cerana* de Malaisie-Indonésie et ne se reproduit que dans le couvain mâle de cette abeille (Koeniger et al., 1981).

Varroa destructor a un génome mitochondrial compact de 15.218 pb (Evans and Lopez, 2002), seulement la souche coréenne (K1) et japonaise (J1) sont capables d'infester et de se reproduire sur *A. mellifera*. La souche J1 est moins virulente (de Guzman and Rinderer, 1999) et a été reportée uniquement chez *A. mellifera* au Japon, en Thaïlande et en Amérique du Nord et du Sud (Anderson and Trueman, 2000). La souche K1 invasive a une répartition cosmopolite (Anderson and Trueman, 2000), Tableau 2). Ces deux souches sont très peu polymorphes et ont une structure quasi-clonale (Solignac et al., 2003). Cependant, deux nouvelles sous-souches K (K1-2), (K1-4), et deux de celle de J (J1-5) (J1-6) ont été récemment découvertes (Navajas et al., 2010) en Asie, ces souches sont capables d'infester également *A. mellifera*, au total de 8 souches coréennes sont connus jusqu'à présent.



Figure 8. Répartition du *V. destructor* (en gris) et *V. jacobsoni* (en jaune) dans le monde

Tableau 2 : Liste des pays infestés par le *V. destructor*, et l'année de sa première description chez *A. mellifera* (Denmark et al., 1991; Dietemann et al., 2006; Fazier et al., 2010).

Pays	Année	Pays	Année
Europe		Panama	2000
USSR	1949	Afrique	
USSR	1964	Tunisie	1978
Bulgarie	1967	Algérie	1981
Yougoslavie, Pologne, Roumanie	1976	Egypte	1989
Allemand	1977	Afrique du Sud	1997
Grèce, Hongrie, Tchécoslovaquie	1978	Botswana.	2002
Finlande	1980	Mozambique	2002
Italie	1981	Zimbabwe	2002
France	1982	Swaziland	2002
Pays- Bas	1983	Sénégal	2007
Suisse, Autriche, Belgique	1984	Afrique de l'Est*	2009
Espagne, Luxembourg	1985	Madagascar	2010
Danemark, Suède	1987	Moyen orient	
Portugal	1988	Turquie	1977
Grand Bretagne	1992	Iran, Libye	1978
Norvège	1993	Israël	1984
Irlande	1999	Arabie Saoudite	1987
Amérique		Irak	1988
Brésil	1971	Océanie	
Paraguay	1975	Nouvelle Guinée	1986
Uruguay, Argentine	1976	Nouvelle Zélande	2000
Bolivia	1980	Asie	
USA	1987	Corée	1950
Canada	1989	Japon	1958
Chile, Mexique, Alaska	1992	Chine	1958
Costa Rica	1998	Hong Kong, Philippines	1963

* Kenya, Tanzanie

III.2-Interaction hôte (*A. mellifera*) - parasite (*V. destructor*)

Les mâles de *V. destructor* sont produits par parthénogénèse arrhénotoque, i.e. issue d'œufs non fécondés et donc haploïdes ($n=7$), les œufs fécondés évoluent en femelles diploïdes ($2n=14$) (Akimovia et al., 1986). L'œuf éclot 60 à 70 h après l'operculation de l'alvéole d'abeille. Le premier œuf pondu se développe en mâle, les suivants sont des femelles. La durée du stade embryonnaire est de 20 à 28 h pour les femelles, 26 à 30 h pour les mâles (Donzé and Guerin, 1994; Ifantidis, 1983; Martin, 1994). Une femelle fondatrice pond 5 à 7 œufs (Martin, 1995; Martin, 1998), la larve éclore passe le stade immature (Fig.9): protonympe et deutonympe (Martin, 1994). La nymphe mobile se nourrit et évolue en un immature immobile quiescent (deutonympe). Il faut 6.5 à 6.9 j (mâle) et 5.5 à 6.2 j (femelle) pour qu'un œuf venant d'être pondu évolue en adulte naissant (Martin, 1994). Le mâle et la femelle montrent un dimorphisme sexuel apparent durant tous les stades de développement (Ifantidis, 1983; Rosenkranz et al., 2010). Les pattes de la femelle sont courtes et munies de structure spécialisées (apotèles) lui permettant d'adhérer sur son hôte (De Ruijter and Kaas, 1983).

La femelle et le mâle ont des biologies complètement différentes. Le mâle pompe les réserves à l'intérieur des alvéoles, il est incapable de sortir des alvéoles, il s'accouple avec ses sœurs dans la cellule (adélphogamie).

Lorsque deux femelles fondatrices pondent dans la même cellule, les croisements peuvent alors se faire entre individus non directement apparentés, ceci réduit la consanguinité en formant un brassage génétique au sein de la population de *V. destructor* (Fernandez and Coineau, 2002).

La femelle est hématophage et vit au dépend de l'hémolymphe de l'abeille. Son cycle de reproduction est découpée en 2 phases successives (Rosenkranz et al., 2010), la phase phorétique et la phase reproductrice. Durant la phorésie, juste après l'émergence, elle s'attache sur le dos d'une abeille adulte de quelques jours à plusieurs semaines (Kuenen and Calderone, 1997). La dérive des ouvrières, le pillage et l'essaimage peuvent favoriser la transmission du parasite aux colonies adjacentes ((Kuenen and Calderone, 1997); un vol de butinage de l'abeille peut mener cet ectoparasite en dehors de la ruche hôte jusqu'à des trajets de 12 km (Frisch, 1967). Le vol d'accouplement de l'abeille atteignant une surface de 80 km² (Ruttner, 1972) pourrait contribuer à disperser l'acarien à longue distance. Néanmoins, l'espèce ne peut survivre sans abeille que pendant une période de 18 à 70 h (Guzzman et al., 1993).

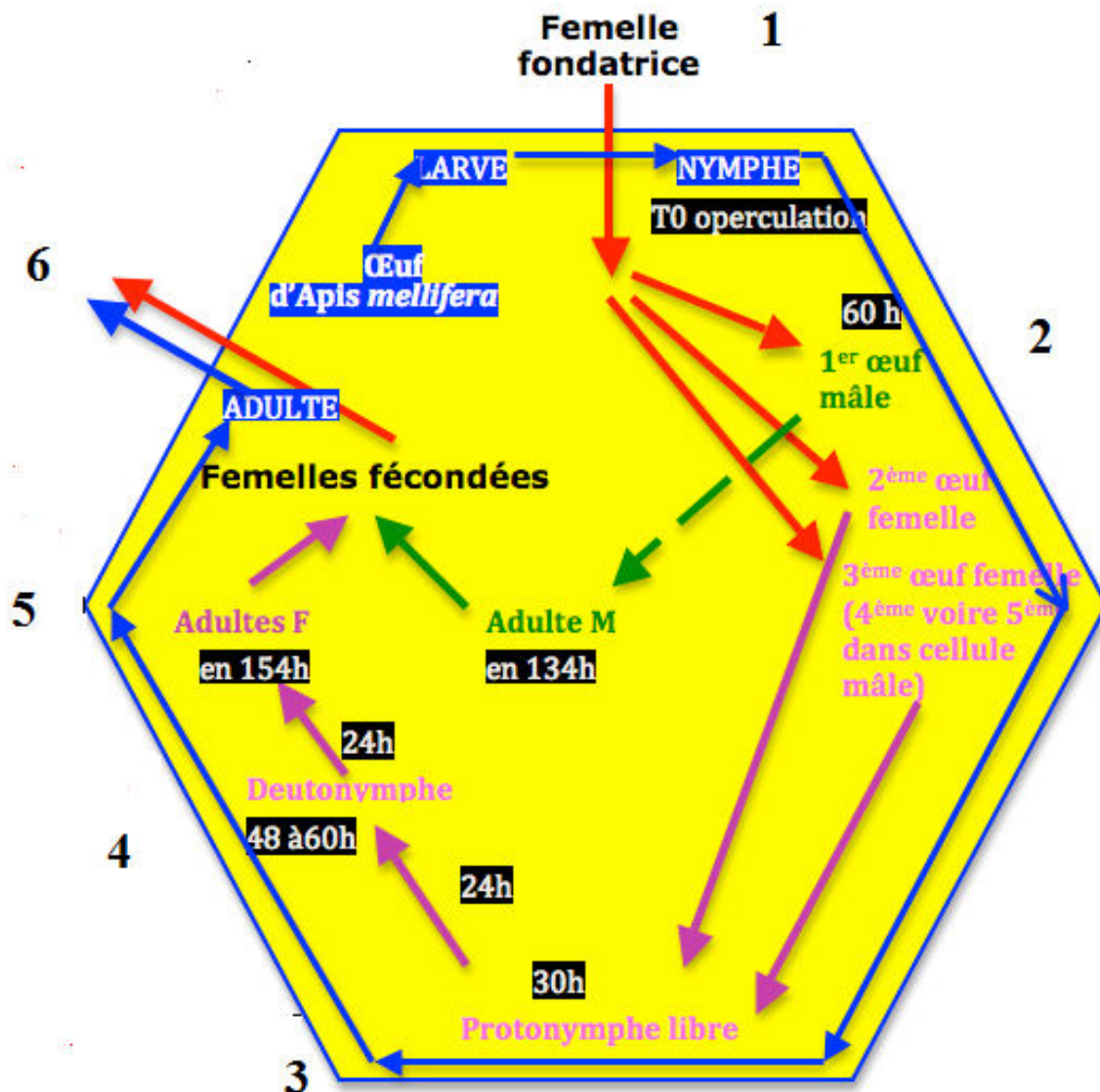


Figure 9. Résumé d'un cycle de développement du *V. destructor* (F : femelle, M : Mâle, en rouge et violet, cycle de la femelle du *V. destructor*, en vert, cycle du mâle et en bleu, cycle de l'abeille).

1-La femelle fondatrice entre dans la cellule du couvain juste avant l'operculation et s'immerge dans la gelée larvaire, 2- après l'operculation, elle se nourrit l'hémolymphe de la nymphe et ponte des œufs, 3- mue larvaire, 4- mue imaginale, 5- accouplement, 6- sortie des femelles fécondées lors de l'émersion de l'abeille et dissémination (Nicolas Vidal-Naquet, 2008).

Durant la phase de reproduction, la femelle se loge dans une alvéole à couvain de stade L5 pour l'accouplement et l'ontogenèse. L'ontogenèse des formes immatures se synchronise avec le cycle de développement de l'abeille (Garrido and Rosenkranz, 2003), Fig.10) puisque elle se déroule dans une alvéole de couvain operculée ; il parasite davantage les larves du faux-bourdon que celles des ouvrières ceci est due à la propriété plus attractive du couvain mâle (Le Conte et al., 1989). Une température et une humidité stable, une source de nourriture accessible, l'absence de prédateur dans les alvéoles operculées sont les conditions favorables pour la reproduction de *V. destructor* (Nazzi, 1994).

III.3-Pathogénicité et virulence

La femelle phorétique se nourrit de l'hémolymph pour la maturation de ses œufs, l'action répétée réduit la teneur en protéine et le poids du corps de l'abeille (Weinberg, 1985). La spoliation quotidienne d'hémolymph lors d'un parasitisme par une femelle adulte est estimée de 0,25 µl à 0,67 µl (Bowen-Walker and Gunn, 2001). L'infestation réduit la durée de vol et augmente la perte des ouvrières durant le butinage (Kralj and Fuchs, 2006).

Les colonies à forte charge en acarien sont affaiblies et produisent très peu de miel (Ericksen et al., 1998) elles sont souvent sujettes à la désertion (Celan, 1971). Les faux bourdons ont un nombre réduit de spermatozoïde, étant donné que le couvain mâle est le plus infesté par le parasite (Duay et al., 2002).

Outre cette spoliation de fluides, l'infection par le *V. destructor* est souvent associée à la transmission ou l'augmentation des charges virales (Bowen-Walker and Gunn, 2001). Il a été recensé environ 18 virus (Chen and Siede, 2007) affectant l'abeille dont les plus connus sont DWV, ABPV, CBPV, SBV, BQCV, KBV, IAPV³, ces virus peuvent être transmis ou non par *V. destructor*. Certains virus sont transmis horizontalement des adultes malades aux couvains par contact de trophallaxie (Boecking and Genersch, 2008). Une transmission verticale de certains virus peut se faire du mâle vers son sperme, de la reine vers ses œufs (Boecking and Genersch, 2008).

L'infection virale peut générer des anomalies physiques des adultes telles les ailes déformées (Marcangeli, 1992), la réduction de la capacité du vol et de la longévité des ouvrières (Amdam et al., 2004). La taille des acini des glandes hypo-pharyngiennes est réduite jusqu' à

³ Deformed Wing Virus (DWV), Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV), Sacbrood Virus (SBV), Black Queen Cell Virus (BQCV), Kashmir Bee Virus (KBV) and Israel Acute Paralysis virus (IAPV)

10 %. De plus, le *V. destructor* affaiblit le système immunitaire de l'abeille (Gregory et al., 2005) et la rend sensible aux attaques des autres pathogènes.

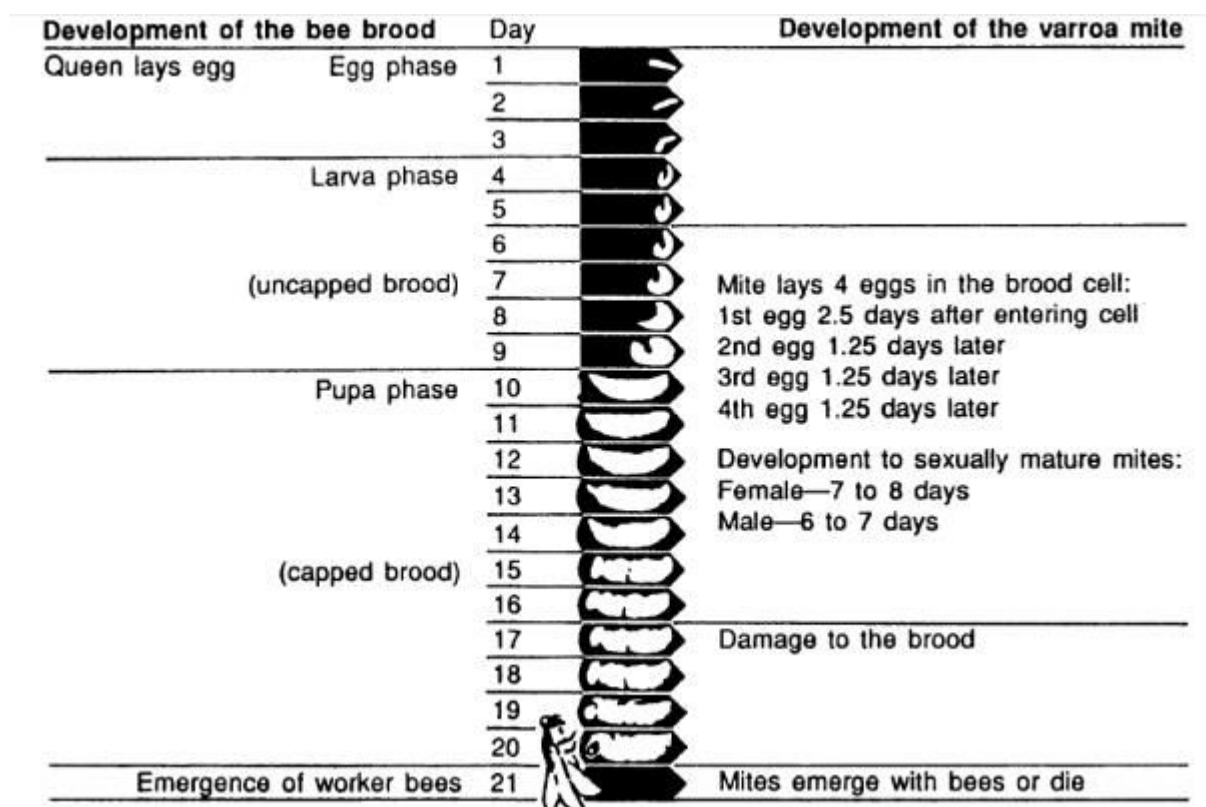


Figure 10. Synchronisation du cycle de vie de l'abeille *A. mellifera* et du *V. destructor* (Denmark et al., 1991).

La spoliation combinée à la mutilation plus la pathologie d'origine virale contribue à un affaiblissement de la colonie. Les butineuses très affaiblies ne peuvent plus revenir dans la ruche, elles meurent dans la nature, ou se retrouvent trainantes dans l'herbe avoisinant la ruche (2 ou 3 mètres près de la ruche) (Bailey, 1969).

III.4- Facteurs limitant du développement de *V. destructor*

La dynamique des populations de *V. destructor* diffère selon les régions géographiques du monde. Bien que le microclimat à l'intérieur de la ruche soit contrôlé par les abeilles, les conditions climatiques (Garcia Fernandez, 1997; Moretto et al., 1991) et les tendances saisonnières (Büchler, 1993) influencent directement ou indirectement (via l'hôte) la dynamique des populations de parasites. Le *V. destructor* a un comportement plus virulent dans les pays en milieu tempéré qu'en milieu tropical (Moretto et al., 1991).

La tolérance signifie que la colonie infestée subit peu ou pas de pertes même si un agent pathogène ou un stress physiologique se produit (Dorland, 1990). La tolérance des abeilles au *V. destructor* varie d'une espèce à l'autre, une colonie d'*A. cerana*, son hôte d'origine, peut

être infestée de plus de 800 acariens par ruche sans périr (Rath and Drescher, 1990). On parle d'un équilibre hôte- parasite. De plus, la tolérance à la varroase varie entre et au sein des populations de différentes sous-espèces (Fries et al., 2006). Les sous espèces issues de lignées européennes sont en général moins tolérantes à la varroase que les autres sous espèces. Les abeilles africaines (et leurs hybrides) telles *A. m. scutellata*, *A. m. capensis* ont été qualifiées tolérantes au *V. destructor* (Allsopp, 2007).

La tolérance à la varroase de certaines populations d'abeilles peut être expliquée par différents paramètres naturels:

-Paramètre 1: le Comportement hygiénique (Fig. 11) est la défense naturelle contre les maladies du couvain comme le couvain calcifié (provoqué par un champignon, *Ascosphaera apis*), la loque américaine (due à la bactérie *Paenibacillus larvae*) et la varroase (Rothenbuhler, 1964; Spivak and Reuter, 2001). En 1964, Rothenbuhler décrit ce comportement, qu'il pense être contrôlé par deux gènes récessifs : l'un permet à l'ouvrière de détecter et de désoperculer une cellule qui contient du couvain malade. L'autre gène pousse les ouvrières à sortir le couvain et s'en débarrasser (Rothenbuhler, 1964). Des études plus récentes indiquent que des dizaines de gènes semblent impliqués dans l'olfaction (Behrens et al., 2011).

Les abeilles hygiéniques discriminent mieux les couvains malades et les évacuent en un temps plus court. Elles sont moins sensibles aux maladies du couvain, l'éviction des larves d'abeille malades provoquant la mort des *V. destructor* immatures. La femelle peut être endommagée durant le processus du retrait de couvain (Spivak and Gilliam, 1998). La lignée d'abeille dite VSH⁴ est capable de détecter les couvains infestés par *V. destructor* et l'élimine rapidement. Cette lignée d'abeille est aujourd'hui répandue dans les ruchers commerciaux mondiaux.

Ce comportement est variable en fonction de conditions environnementales, par exemple, juste une simple entrée de nectar dans la ruche pourra avoir un impact sur ce comportement (Panasiuk et al., 2009); en outre, les nettoyeuses sont plus actives en période de miellée.

La taille de la colonie a un impact sur sa capacité hygiénique, plus la colonie est populeuse, plus la capacité de nettoyage est rapide (Najafgholian et al., 2011)

Le comportement hygiénique varie en fonction de l'âge de l'abeille, les jeunes ouvrières âgées de 6 jours ont une bonne activité hygiénique (Panasiuk, 2010).

⁴ VSH (Varroa Sensitive Hygienic)

Les ouvrières dépensent plus de temps à nettoyer le couvain la journée que la nuit surtout si les cadres sont neufs, le cycle jours et nuits influence légèrement la rapidité du nettoyage (Pereira et al., 2013).

La charge virale a un impact sur le comportement hygiénique : les couvains fortement infestés en particulier par le virus DWV, c'est-à-dire des couvains à fortes anomalies sont beaucoup plus retirés par les ouvrières que les moins parasitées (Schöning et al., 2012).

Le comportement hygiénique peut être testé artificiellement dans les colonies sans *V. destructor*; les couvains dans les cellules operculées sont tués en les perçant à l'aide d'une épingle entomologique ou encore, on peut congeler une portion délimitée de couvain operculé simplement à l'azote liquide. Une lignée Hyg⁵ est une colonie ayant un score de nettoyage de 95% en 48 h pour 100 cellules congelées d'après (Spivak, 1996).

-Paramètre 2 : L'épouillage est un comportement dans lequel l'abeille s'épouille elle-même (auto-épouillage) ou une autre abeille voisine (allo-épouillage) quand elle est irritée par l'acarien (Boecking and Spivak, 1999). Certaines ouvrières tuent l'acarien à l'aide de leurs mandibules (Szabo et al., 1996). Si l'acarien persiste, les ouvrières performant un mouvement de danse en vibrant leur corps. Des mouvements latéraux de l'abdomen sont réalisés vigoureusement pour attirer les épouilleuses (allo-épouillage).

En moyenne 38.5% d'acariens vivants placés sur des abeille marquées étaient enlevés par les ouvrières des abeilles africanisées alors que seulement 5.7% des acariens ont été enlevés par les abeilles italiennes pendant une durée de 30 minutes (Moretto et al., 1991). La capacité d'épouillage d'*A. cerana* est plus intensive et efficace que celle d'*A. mellifera* (ex : *A. m. ligustica*) (Fries et al., 1996).

Cependant, la femelle *V. destructor* présente un caractère d'adaptation pour éviter les réactions de l'abeille hôte, elle se fixe entre les sclérites abdominaux ((Boecking and Ritter, 1993) où les ouvrières ne peuvent pas sentir l'irritation causée par les glandes salivaires durant la spoliation (Peng et al., 1987). L'héritabilité de ce caractère est trop faible ($h < 0,15$, (Ehrhardt et al., 2007).

⁵ Hyg: une lignée hygiénique

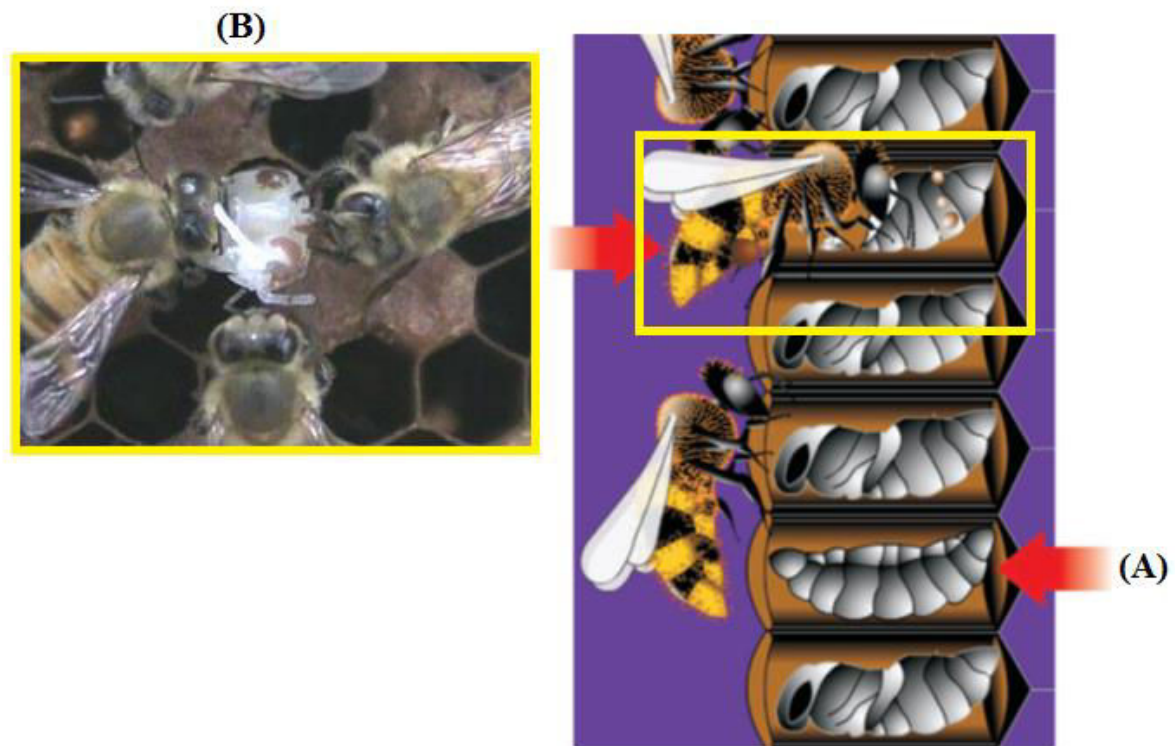


Figure 11. Illustration du comportement hygiénique de l'abeille.

A- une larve d'abeille

B- la nymphe infestée est débarrassée par des ouvrières.

Le comportement hygiénique est découpé en trois étapes (Panasiuk et al. 2009) : la reconnaissance du couvain malade (larve ou nymphe), la désoperculation, le nettoyage de l'alvéole (complète ou partielle).

-Paramètre 3 : La durée de la période de post-operculation du couvain varie suivant les sous-espèces d'abeille et suivant la saison (Büchler and Drescher, 1990). Puisque l'acarien se reproduit dans les cellules des couvains (mâles et ouvrières), son développement est contraint par celui de son hôte. Une plus courte durée de développement chez les ouvrières abeilles (comme observée chez *A. cerana*) empêcherait le développement complet des individus parasites, et diminuerait ainsi l'effectif de la population de *V. destructor* (alors limité aux cellules de couvain mâles). Une durée de 12 j de la période post-operculation de couvain ouvrière est généralement suffisante pour 3 femelles d'acarien à acquérir leur stade adulte (Martin, 1994). Une courte durée 275 à 278 h, soit équivaut à environ 11 j, diminue la fertilité de la femelle (Ritter and De Jong, 1984). Le *V. destructor* entre dans la cellule des ouvrières 15 à 20 h et 40 à 50 h dans la cellule mâle avant l'operculation (Boot et al., 1992). Le comportement d'operculation de la cellule par les ouvrières est stimulé par la présence des

kairomones à la surface des couvains (Trouiller et al., 1992). La période d'operculation est fortement influencée par plusieurs facteurs. La durée moyenne d'operculation est plus courte au début de l'été qu'à la fin de l'été (Büchler and Drescher, 1990), fait probablement lié à la température ou à des facteurs nutritionnels. Un manque de couvain a aussi un effet sur la durée d'operculation (Moritz and Jordan, 1992). L'héritabilité de ce comportement est $h=0.8$ (Moritz, 1985)

- Paramètre 4 : Production de femelle « Infertilité » et non reproductive

Les femelles deviennent infertiles à cause de la mort prématurée de la progéniture mâle (Martin et al., 1997) et de plus; une femelle fondatrice ne produit qu'un seul mâle par cycle reproductif alors que ce mâle fertilise tous ses sœurs (4 femelles en moyenne),-Une femelle a en moyenne 1.5 à 2 cycles de reproduction (Fries and Rosenkranz, 1996).

Certaines femelles fondatrices entrent dans les cellules de couvain, mais ne pourront pas démarrer leur reproduction, ne détectant pas le moment opportun pour leur ponte.

Selon (Milani, 1999), les médiateurs chimiques présents à la surface des larves L5 d'ouvrières pourraient jouer un rôle important dans la régulation de la reproduction de *V. destructor* (Milani, 1999). Cette baisse de fertilité du parasite, n'est observée que chez certaines lignées d'abeilles (SMR⁶ ; (Harbo and Harris, 2005).

-Paramètre 5 : D'autres facteurs abiotiques peuvent perturber le succès reproductif du parasite. Un espace plus réduit de la cellule de couvain (dimension alvéolaire de 4,9 mm) empêcherait la femelle du *V. destructor* de se loger dans la cellule (Martin and Kryger, 2002; Piccirillo and De Jong, 2003) et réduirait la possibilité de reproduction de *V. destructor*.

-Paramètre 6 : L'essaimage est un processus naturel de division de la colonie d'abeilles en deux parties, la reine avec une partie des ouvrières (60 à 70%) quittent la ruche pour fonder un nouvel essaim (Council, 2013). La tendance extrême à l'essaimage de l'abeille aiderait à contrer les infestations à *V. destructor* (Fries et al., 2003; Wilde et al., 2005). En effet, durant cette période, la nouvelle colonie fondée est sans couvain, le *V. destructor* ne pourra pas se reproduire. Les abeilles africaines ont une forte tendance à essaimer, c'est un comportement indésirable pour l'élevage mais il permet aux abeilles africaines de combattre contre l'infestation par la varroase (Allsopp, 2007).

Plusieurs études cherchent à comprendre par comparaison d'expression des gènes, quel seraient les gènes impliqués dans une forte tolérance, néanmoins, il est connu que le

⁶ SMR : Suppressed Mite Reproduction

parasitisme change l'expression du gène relatif au développement embryonnaire, au métabolisme cellulaire et à l'immunité de l'abeille (Navajas et al., 2008); les souches tolérantes acquièrent de changement d'expression de gène régulateur de l'olfaction et de la sensibilité aux stimuli (Navajas et al., 2008).

Pour comprendre l'interaction hôte- parasite entre la sous-espèce africaine *A. m. unicolor* (Fig. 12) et le *V. destructor*, il est intéressant de connaître la diversité génétique de la population hôte avant infestation, ainsi que ses impacts sur les cheptels d'abeille à Madagascar, de même quelle est la réaction d'*A. m. unicolor* face à ce nouveau parasite.



Figure 12. Femelle phorétique de *V. destructor* sur le dos d'une reine d'abeille d'*A. m. unicolor* (Photo : Niaina)

OBJECTIFS

Les objectifs de la thèse sont de connaître la diversité génétique et le comportement de l'abeille malgache, *A. m. unicolor*, face à son parasite *V. destructor*. Pour atteindre cet objectif, notre travail a été focalisé en 3 volets:

- 1- L'étude de la diversité et de la structuration génétique de l'abeille à Madagascar. La diversité génétique a été mesurée grâce à différents marqueurs (mitochondrial et nucléaire) avec un important échantillonnage entrepris au sein de la majorité des régions de Madagascar.
- 2- L'étude de la diversité génétique du parasite *V. destructor*, de sa répartition dans l'ensemble de l'île, et de ses impacts sur les ruchers malgaches a été menée. L'ensemble de ces approches constitue un élément clé pour comprendre comment *V. destructor* se développe et évolue au sein des populations d'abeille malgache.
- 3- L'étude du comportement hygiénique de l'abeille *A. m. unicolor*. L'objectif est d'observer la diversité des réponses hygiéniques des colonies et de repérer celles qui ont des niveaux élevés de nettoyage.

Notre présentation s'organise en trois grandes parties. La première est une synthèse bibliographique sur les données concernant le matériel biologique : l'abeille *A. mellifera* et l'acarien *V. destructor*. Les résultats sont développés dans les chapitres suivants sous forme d'article écrit (4 article) en anglais déjà publiés ou en cours de publication. La troisième partie de ce manuscrit s'attache à une discussion générale sur l'ensemble des résultats marquants, et présente les conclusions et perspectives générales de Cette thèse.

CHAPITRE I

Diversité génétique de l'abeille endémique malgache

Apis mellifera unicolor (Hymenoptera : Apidae)

Henriette Rasolofoarivao, Johanna Clémencet, Maéva Angélique Techer, Lala Harivelo Raveloson Ravaomanarivo, Bernard Reynaud, Hélène Delatte

Ce chapitre a été soumis au journal Apidologie (en Mars 2014).

Résumé

Apis mellifera unicolor est une abeille tropicale, endémique de Madagascar. Notre objectif a été d'étudier sa diversité et sa structuration génétique. L'échantillonnage a été fait sur des ouvrières adultes issues de 884 colonies provenant de 18 régions administratives de Madagascar. Les méthodes de PCR-RFLP et de séquençage ont été utilisées pour révéler la présence de variabilité au sein de la région COI -COII de l'ADN mitochondrial, puis 17 loci microsatellites ont été utilisés pour l'étude de la diversité nucléaire. Trois profils PCR-RFLP ont été observés, avec 99.59% appartenant à de l'haplotype A1 et 0.41% à de l'haplotype A4. Un niveau d'hétérozygotie moyen a été trouvé en termes de diversité nucléaire, avec un nombre d'allèles moyen par locus variant de 2.47 à 3.88 par population. Les méthodes bayésienne (structure) et graphiques (ACP) regroupent les populations en 2 groupes génétiques qui correspondent à des régions géographiques. Plusieurs hypothèses sont discutées en ce qui concerne la faible diversité génétique d'*A. m. unicolor* dans son aire d'origine et sa structuration.

Mots clés : *Apis mellifera unicolor*, microsatellite, lignée africaine, diversité génétique, ADNmt

Genetic diversity of the endemic honeybee: *Apis mellifera unicolor* (Hymenoptera: Apidae) in Madagascar

Henriette Rasolofoarivao^{*+°}, Johanna Clémencet[°], Maéva Angélique Techer^{*°}, Lala Harivelo Raveloson Ravaomanarivo⁺, Bernard Reynaud^{*}, Hélène Delatte^{*}

^{*}CIRAD, UMR PVBMT, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

⁺Département d'Entomologie, Faculté de Sciences, Université d'Antananarivo, B.P. 906, Antananarivo (101), Madagascar

[°]Université de La Réunion, UMR PVBMT, 97715 Saint Denis cedex 9, La Réunion, France

Running title: Genetic diversity of honeybee in Madagascar

Abstract

Apis mellifera unicolor is a tropical honeybee endemic of Madagascar. Comprehensive knowledge about its mitochondrial and nuclear genetic diversity and structuration was our main purpose. Samples were made on adult workers of 884 colonies of 18 regions. PCR-RFLP and sequencing were used to reveal variability in the COI –COII mtDNA region, then 17 microsatellite loci were used for studying the nuclear diversity. Three PCR-RFLP profiles were observed, among which 99.59 % of them were from the A1 haplotype, 0.1% of a new A haplotype, 0.41 % was associated with an A4 haplotype. Moderate genetic diversity values were found, together with low mean number of alleles ranging from 2.47 to 3.88 over all loci per population. Bayesian clustering method assignment and PCA separated populations into two well differentiated genetic clusters which matched with geographic areas. Several hypotheses are further discussed regarding to the low genetic diversity of *A. m. unicolor* in its native range.

Key words: *Apis mellifera unicolor*, microsatellite, African lineage, genetic diversity, mtDNA

Introduction

Apis mellifera subspecies are the most economically valuable pollinators of crop monocultures worldwide (Klein et al., 2007). In addition, honeybee contribution to floral biodiversity and conservation through pollination is estimated to affect 80 % of wild flora (Batra, 1995; De la Rua et al., 2009).

Remarkable morpho-geographical differentiations are found throughout honeybee distribution areas; 28 subspecies are endemic to Africa, Europe and Middle East (Sheppard et al., 1997; Sheppard et al., 2003). Five evolutionary lineages have been described based on phenotypes (Ruttner et al., 1978; Ruttner, 1988) and molecular traits (Garnery et al., 1992; Garnery et al., 1993; Estoup et al., 1995; Franck et al., 2000; Franck et al., 2001; Alburaki et al., 2013).

In Africa, 10 subspecies are found from all lineages except from the C lineage (Hepburn et al., 1998). The African A lineage is endemic to Africa and subspecies include *A. m. scutellata* (Lepeletier, 1836), *A. m. capensis* (Eschscholtz, 1822), and *A. m. unicolor* (Latreille, 1804).

Apis mellifera unicolor is the endemic subspecies of Madagascar, a drifted tropical island, located 400 km off the East coast of Africa. Madagascar is among the 5 richest biodiversity hotspots of the world in terms of endemic plants and vertebrate species (Myers et al., 2000). However, less than 10 % of its original habitat still remains (Myers et al., 2000). In such an area of endemism, with over 80 % of endemic phanerogam (Ganzhorn et al., 2001) the role of pollinating insects is vital for the reproduction of these plants. Although the pollinating role of the honeybee has never been investigated in detail for these floras, *A. m. unicolor* is thought to play a crucial role in the pollination of endemic phanerogam species (Ruttner, 1975; Ralalaharisoa-Ramamonjisoa, 1996).

After molecular analysis, mitotype A_I was attributed to the honeybee of Madagascar, with a surprising absence of mitochondrial polymorphism within this endemic subspecies (Franck et al., 2001). The latest molecular study using SNP analyses suggested that *A. m. unicolor* had a specific SNP (Whitfield et al., 2006). However, those assumptions were based on a low number of samples (<50) taken from regions of the vast territory of Madagascar. In terms of morphological and behavioral criteria, two ecotypes were described, the first from the Highlands (Hauts Plateaux) and the second from the coastal area (Ruttner, 1988).

Since the recent arrival of the parasitic mite *Varroa destructor* documented in Madagascar in 2010, severe colony losses have been observed (Rasolofoarivao et al., 2013). This situation may dramatically impact the biodiversity of Madagascar.

Therefore, considering the lack of genetic data and the threat to this subspecies, it appears necessary to improve our knowledge of and characterize *A. m. unicolor* genetic diversity in its native area.

Materials and methods

Area of study

The land area and relief of Madagascar gives rise to various climatic zones. The year is characterized by two distinct seasons: the austral winter (April to November) and the austral summer (December to March). The coastal zones enjoy a warm climate and mean annual temperatures range between 22 - 25°C. The upland areas of the island have a more temperate climate with a mean annual temperature of 20°C. Tropical forests mainly consist of deciduous woodland in Western Madagascar and xerophytic thorn forests in the southern region (Fig. 1).

Sampling and DNA extraction

One adult worker honeybee per colony was sampled between August 2011 and March 2013 from 76 sites (n = 884) from 18 different administrative regions in Madagascar (SD Table 1, Fig.1). Sampling was performed in apiaries and 33 wild colonies, collected in Djamajar (S8) n = 6, Antsoha (S7) n = 9, Rantolava (S24) n = 3, and Tsararano (S21) n = 15. Honeybees were preserved in ethanol (96 %) and kept at -20 °C until molecular analysis. When *Varroa destructor* mite was visually observed in the sampled hive it was reported (* in SD Table 1), such as in Rasolofoarivao et al., 2013. The six worker legs were used for DNA isolation. DNA was extracted from individual honeybees as previously described (Delatte et al., 2010). All individuals were subjected to both microsatellite and mitochondrial analyses.

Supplementary data Table 1. Sites description. For each of the 76 sampled sites, code (referring to figure 1), name, administrative region of origin and number of sample (i.e colony) successfully amplified for nuclear genetic analysis are given. Asterisks indicate presence for *Varroa destructor* at the collection date.

Map codes	Sites (S)	Administrative region (R)	N	Map codes	Sites (S)	Administrative region (R)	N
1	Angahimena	D.I.A.N.A. (R1) ¹	3	39	Ambohidratrimo A.*	Analamanga (R9)	9
2	Namakia	D.I.A.N.A. (R1) ¹	10	40	Ivato*	Analamanga (R9)	17
3	Antanambao	D.I.A.N.A. (R1) ¹	4	41	Ankatso*	Analamanga (R9)	2
4	Antanambao 1	D.I.A.N.A. (R1) ¹	5	42	Andramasina*	Analamanga (R9)	10
5	Sakaramy	D.I.A.N.A. (R1) ¹	4	43	Tonoronala	Itasy (R10)	33
6	Antsakoabe	D.I.A.N.A. (R1) ¹	3	44	Tsiroanomandidy	Bongolava (R11)	5
7	Antsoha A.	D.I.A.N.A. (R1) ¹	9	45	Bemasoandro*	Vakinakaratra (R12)	8
8	Djamajar	D.I.A.N.A. (R1) ¹	6	46	Ankotsaka*	Vakinakaratra (R12)	7
9	Marompamba A.	D.I.A.N.A. (R1) ¹	3	47	Ihazolava*	Vakinakaratra (R12)	12
10	Mahavelona	D.I.A.N.A. (R1) ¹	6	48	Anativato* 1	Vakinakaratra (R12)	7
11	Analamandrarofo	S.A.V.A. (R2) ²	16	49	Anativato* 2	Vakinakaratra (R12)	11
12	Analapenja	S.A.V.A. (R2) ²	4	50	Mahazina*	Vakinakaratra (R12)	10
13	Analapenja	S.A.V.A. (R2) ²	11	51	Antsirabe *	Vakinakaratra (R12)	4
14	Andranomatsioka	S.A.V.A. (R2) ²	3	52	Soanirina	Amoron'i M. (R13)	11
15	Antohomarina	S.A.V.A. (R2) ²	22	53	Ambositra	Amoron'i M. (R13)	10
16	Antohomarina	S.A.V.A. (R2) ²	5	54	Tsararano A.	Amoron'i M. (R13)	43
17	Sarahandrano	S.A.V.A. (R2) ²	5	55	Vohimasina	Amoron'i M. (R13)	22
18	Belle Rose	S.A.V.A. (R2) ²	9	56	Morondava	Menabe (R14)	4
19	Beromba	Sofia (R3)	2	57	Mahabobe	Menabe (R14)	1
20	Tsararano M.1	Boeny (R4)	10	58	Tsimahavaobe	Menabe (R14)	6
21	Tsararano M.2	Boeny (R4)	15	59	Tsimahavaokely	Menabe (R14)	2
22	Tsaramandroso	Boeny (R4)	10	60	Analahiva	Menabe (R14)	3
23	Andranofasika	Boeny (R4)	5	61	Ankilozato	Menabe (R14)	1
24	Rantolava*	Analanjirifo (R5)	3	62	Manitsara	Menabe (R14)	6
25	Mahambo*	Analanjirifo (R5)	2	63	Androvabe	Menabe (R14)	11
26	Fenerive* 1	Analanjirifo (R5)	1	64	Androvabe PM	Menabe (R14)	7
27	Fenerive* 2	Analanjirifo (R5)	1	65	Manakara	Vato V. (R15)	5
28	Ambodihazomamy*	Antsinanana (R6)	3	66	Toliary	Atsimo A. (R16)	30
29	Anivorano B.*	Antsinanana (R7)	1	67	Bezaha	Atsimo A. (R16)	23
30	Sahavazo M. *	Alaotra M. (R8)	1	68	Mahatalaky	Anosy (R17)	17
31	Masakalina*	Analamanga (R9)	8	69	Mahatalaky	Anosy (R17)	8
32	Ambohitolomahitsy*	Analamanga (R9)	7	70	Ifarantsy	Anosy (R17)	10
33	Amby*	Analamanga (R9)	8	71	Ifarantsy 1	Anosy (R17)	16
34	Ambotsecheno*	Analamanga (R9)	19	72	Ampasy N.	Anosy (R17)	10
35	Betoho*	Analamanga (R9)	16	73	Ampasy N.1	Anosy (R17)	6
36	Anjepy*	Analamanga (R9)	12	74	Soanierana	Anosy (R17)	21
37	Maharidaza*	Analamanga (R9)	10	75	Ankaramena	Anosy (R17)	13
38	Mandraka*	Analamanga (R9)	12	76	Ambovombe	Androy (R18)	15

¹D.I.A.N.A.: Diego, Ambilobe, Nosybe, Ambanja ;S.A.V.A.: Sambava, Antalaha, Vohemar, Andapa.

Microsatellite amplification and genotyping

Microsatellite population studies were carried out using 17 loci published in Solignac et al., (2003), and combined into four different mixes (mix1: A024, A113, Ac306, Ap055, Ap081; mix 2: A (B)124, A028, A029, A088, Ap273, Ap289; mix 3: Ap033, A035, Ap036; mix 4: A014, Ap043, Ap066). PCR reactions were performed in a 10 µl final reaction volume with a primer mix (10 µM) using Type-it Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN) kits. PCR programs were run with an initial denaturation of 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s; annealing was 55°C for 30 s for mix 1 and 52°C for mix 2-4, followed by elongation at 72 °C for 30 s to 45 s. A final extension was done at 72 °C for 10 to 20 min.

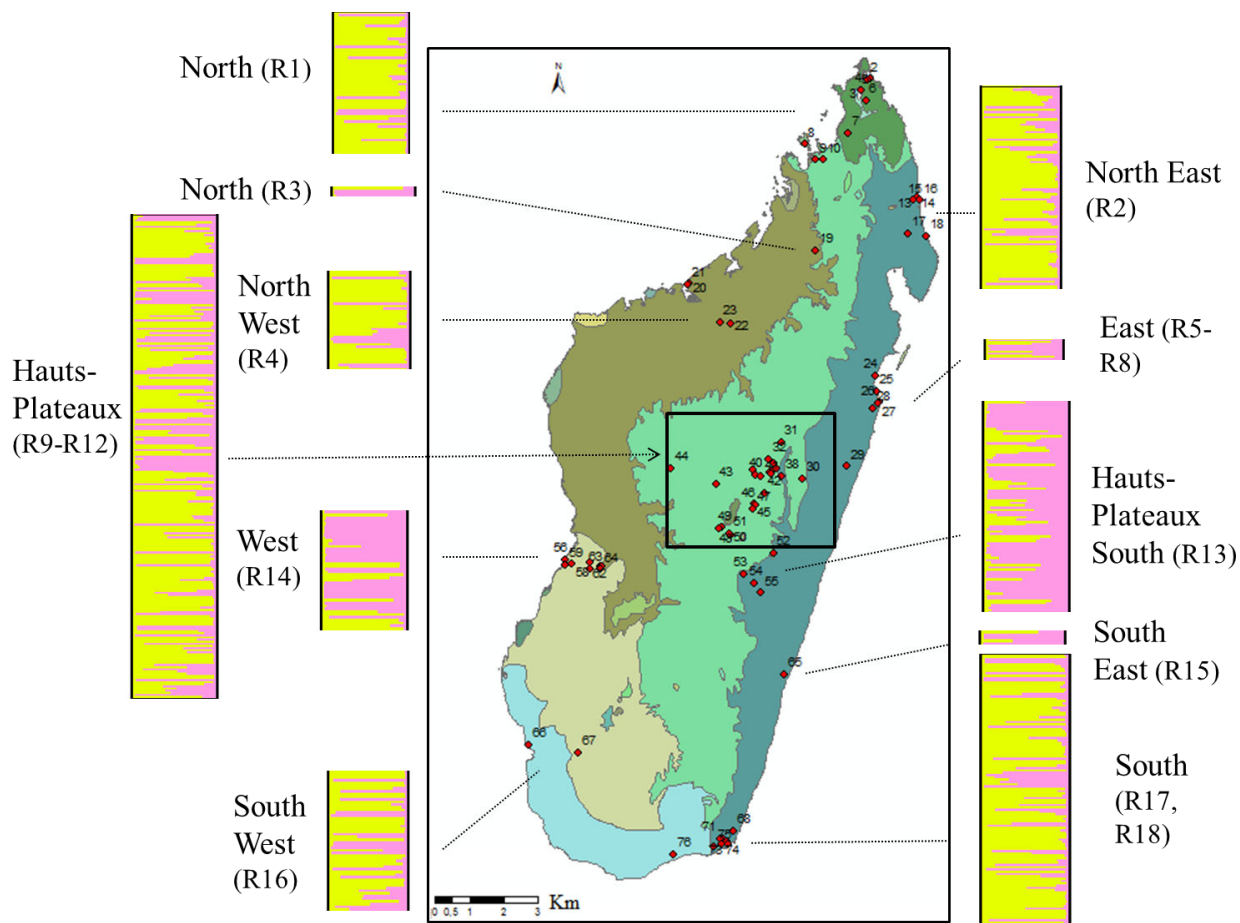
Samples were further genotyped using an automated DNA sequencer (Applied Biosystems 3130XL) with capillaries. Allele sizes were scored using Gene Mapper v4.0 Software. Individuals with genotype data missing for more than 40 % of all loci were excluded from statistical analysis. Small sample sizes under 10 individuals per site were not included in the nuclear genetic analysis at population level.

Microsatellite analysis

Observed (H_o), expected (H_e) and Nei's 1987 unbiased expected ($H_{n.b}$) heterozygosity and fixation indices (F_{is}) (Weir et al., 1984) were estimated using Genepop 4.2 (Rousset, 2008). All pairs of loci were tested for linkage disequilibrium using Genepop 4.2 (Rousset, 2008). Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) were tested using a two-tailed Fisher exact test based on Markov-chain (Rousset, 2008).

Permutation tests conducted by FSTAT (Goudet, 2001) determined whether genetic diversity (H_e , $H_{n.b}$, H_o) and F_{is} differed significantly between geographical regions.

FreeNA (Chapuis et al., 2007) was used to estimate null allele frequencies. Population differentiation was quantified by calculating pairwise F_{ST} values (Weir and Cockerham, 1984) and verifying their significance through the permutational test in Genetix 4.05 (Belkhir et al., 1996).









-  North: dry deciduous forest, dry tropical climate
-  West: dry deciduous forest, hot tropical climate during dry season
-  Center: high land, sub humid forest, altitude tropical climate
-  East: wetter area of island, lowland forest, sub equatorial climate
-  South: half desert, spiny thickets, dry tropical climate
-  South west: succulent woodlands, dry tropical climate

Figure 1. Madagascar map with ecological zonation and honeybee sampling sites (emplacements of each site are presented in red polygons). The 76 sites are spread in 6 geographic regions. Each number represents a site with correspondence in table 1. Plots of admixture, constructed with Clumpp and Distruct softwares, displayed the results of the analysis performed with Structure, assuming $K=2$ genetic clusters.

Relationships between genetic and geographic distances at all sites were tested using Mantel's test in Genepop 4.2 (Rousset, 2008). The significance of the correlation between matrices of geographical and genetic distances among pairs of sites was tested using 1000 permutations of the data. As potential isolation by distance (ibd) patterns may not hold over the entire range (1470 km), because at some point the influence of gene flow is expected to be weak relative to the influence of genetic drift and homoplasy (Hutchison et al., 1999), ibd patterns were investigated at smaller spatial scales, i.e. in sites from the northern regions (500 km, $n = 7$), the central regions (370 km, $n = 15$) and southern regions of the island (380 km, $n = 9$). We further investigated the importance of scale on spatial genetic structuring by performing a hierarchical F analysis, which estimates the genetic variation found at each hierarchical level. A nested tree-level analysis of molecular variance (AMOVA, (Excoffier et al., 2010)) was performed by partitioning the total sum of square into components representing variation between geographical regions, among sites within regions and among individuals within sites using Arlequin V3.5 (Excoffier et al., 2010).

Levels of population admixture were quantified using a number of Bayesian clustering procedures as implemented in Structure V2.3.4 (Pritchard et al., 2000). The number of population clusters was inferred according to Evanno et al. (2005) and the ad hoc statistic ΔK was calculated for K ranging from 1 to 20. This ad hoc statistic was processed through the Structure Harvester website (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>). Structure was run for 1 million generations (burn-in = 100 000 generations) with 13 iterations for each value of K .

Clumpp v.1.1.2 (Jakobsson et al., 2007) was used to align the best of the 4 repetitions of the K . Distruct v.1.1 (Rosenberg, 2004) was used to graphically display the results.

A Principal Component Analysis (PCA) was performed on the genetic data to visualize genetic differentiation among the population groups using Adegnet 1.4 (Jombart, 2008) in R-software (Team, 2005).

Mitochondrial analysis

Mitochondrial DNA COI- COII region was amplified using two specific primers, e₂ and H₂ (Garnery et al., 1992). Amplification and PCR cycles were as described in Garnery et al. (1992). The size of the fragment amplified was visualized using 5 µl of the PCR products electrophoresed on 2 % agarose gel. PCR products were then used both for enzymatic restriction and sequencing.

Ten µl of PCR products (n = 884) were enzymatically digested by the *DraI* (Promega ©) enzyme according to manufacturer recommendations. The resulting fragments were separated in 4 % agarose gel. Each enzymatic profile was scored and compared to expected sizes published (Garnery et al., 1992; Franck et al., 2001). Each profile with a different band pattern observed on gel was sent for sequencing (see below) plus about 21% of the dominant profile. PCR products (n = 191) were sent to MacroGen© for sequencing. Of these, some were taken from wild colonies (site Tsararano (S21) n = 15). DNA sequences results were aligned using MEGA 5.04 (Kumar et al., 2008) then analyzed by BLAST search on GenBank. Genetic relationships between the different sequences obtained for the A1 haplotypes were investigated by constructing a minimum-spanning network of the haplotypes with TCS software (Clement et al., 2000).

Results

Diversity indices

Of the 884 individuals sampled, 710 were successfully amplified for at least 60 % of the 17 loci used. Of the 76 sampled sites, only 32 have more than 10 individuals (SD Table 1). Analysis for linkage disequilibrium showed no significant deviation from equilibrium among the 17 microsatellites marker pairs (all $P > 0.05$), except between loci A113 and A24 ($P < 0.05$).

Average number of alleles per population and over 17 markers varied between 2.47 and 3.88 (Table 1). However, the number of alleles per locus ranged from 3 (Ap273) to 18 (Ap043) for all populations (data not shown).

Expected heterozygosity H_e ranged from 0.34 to 0.47 and Estimated heterozygosity $H_{n,b}$ from 0.36 to 0.50 (Table 1). Across all loci, less than 10 % null-allele was observed (Table 1).

Inbreeding coefficient F_{is} ranged from heterozygote excess (outbreeding, -0.07) to heterozygote deficiency (inbreeding, 0.15) compared with HWE expectations. No difference was detected among geographical regions (cf. SD Table 2, Comparisons among groups, all $P > 0.4$).

Supplementary data Table 2. Genetic diversity indices per geographical regions investigated in Madagascar.

Geographical				
region	H_O	H_S	F_{IS}	F_{ST}
North-East	0.365	0.403	0.094	0.019
North-West	0.371	0.432	0.140	0.013
Hauts- Plateaux (central)	0.374	0.410	0.087	0.058
Hauts- Plateaux (South)	0.374	0.398	0.061	0.003
West South	0.368	0.410	0.101	0.025
South	0.383	0.415	0.076	0.006

Genetic structure

F_{ST} estimates among pairs of sites ranged from -0.02 to 0.17, with 318 out of 496 genetic differentiation estimates being significantly different from zero (SD Table 4). Within each of the northern, central and southern parts of the island (<500 km between sites), nuclear genetic differentiation between sites was positively correlated with the logarithm of geographical distance (Fig. 2. abc). However at the island scale (North to South: 1470 km, $n = 32$), the correlation between the two matrices was no longer significant (Mantel test, $P = 0.87$; Fig. 2d).

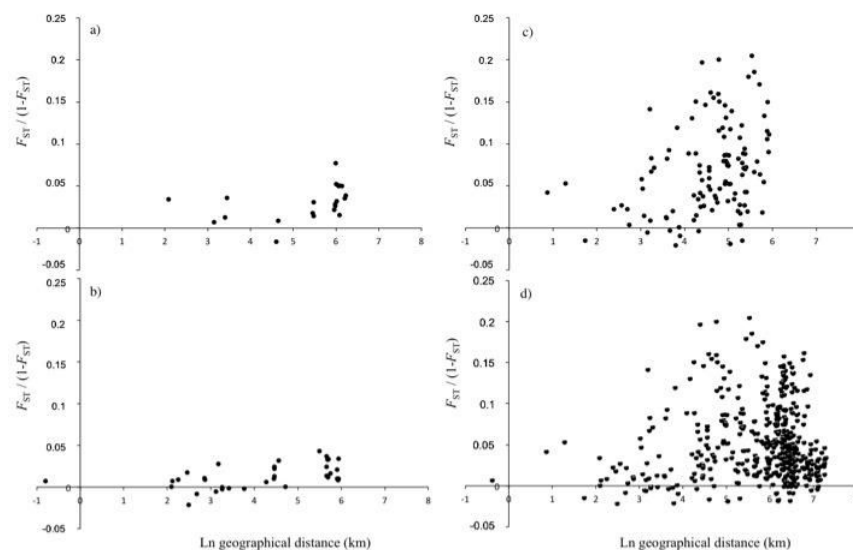


Figure 2. Relationship between logarithm of geographical distance and nuclear genetic differentiation as estimated as $F_{ST}/(1 - F_{ST})$, between **a)** sites from the northern region only ($n=7$, $P = 0.014$), **b)** the southern region only ($n = 9$, $P = 0.0027$), **c)** sites from Hauts Plateaux only ($n=16$ sites, 120 combinations, Mantel test $P = 0.014$) and **d)** sites from all regions sampled in Madagascar ($n=32$ sites, 496 combinations, Mantel test $P =$

0.84.

Table 1. Genetic diversity indices by sites. For each site are indicated: their geographical region, number of individuals per site (N), expected heterozygosity (H_e), expected unbiased heterozygosity ($H_{n.b.}$), observed heterozygosity (H_o), estimate of Wright's (Weir and Cockerham 1984) fixation index (F_{is}),* indicate deviations from HWE, mean number of allele (N_{br}). An: mean null allele frequency. Only sites with at least 10 individuals per apiary are considered;

Geographical regions	Map codes	Sites (S)	N	H_e	$H_{n.b.}$	H_o	F_{is}	N_{br}	An
North	2	Namakia	10	0.38	0.40	0.42	-0.07	2.47	0.05
North-East	11	Analamandrofo	16	0.42	0.44	0.38	0.11*	3.47	0.06
	13	Analapenja	11	0.35	0.37	0.34	0.08	2.76	0.02
	15	Antohomarina	22	0.38	0.39	0.34	0.14	3.29	0.07
North West	20	Tsararano M.	10	0.38	0.40	0.39	0.01	3.00	0.02
	21	Tsararano M.	15	0.43	0.44	0.37	0.16*	3.35	0.07
	22	Tsaramandroso	10	0.42	0.45	0.35	0.21*	3.18	0.07
Hauts Plateaux	34	Ambotseheho	19	0.40	0.41	0.34	0.18*	3.24	0.08
	35	Betoho	16	0.38	0.39	0.35	0.10	2.94	0.05
	36	Anjepy	12	0.42	0.44	0.42	0.04	3.24	0.04
	37	Maharidaza	10	0.38	0.41	0.40	0.02	2.76	0.03
	38	Mandraka	12	0.40	0.41	0.38	0.09	3.06	0.05
	40	Ivato	17	0.43	0.45	0.41	0.06	3.18	0.07
	42	Andramasina	10	0.43	0.46	0.40	0.14	3.12	0.06
	43	Toronala	33	0.38	0.39	0.36	0.07*	3.53	0.05
	47	Ihazolava	12	0.38	0.40	0.36	0.09	3.06	0.06
	49	Anativato	11	0.40	0.42	0.43	- 0.02	3.00	0.05
	50	Mahazina	10	0.34	0.36	0.32	0.11	2.94	0.05
Hauts Plateaux South	52	Soanirina	11	0.37	0.40	0.40	-0.04	2.56	0.05
	53	Ambositra	10	0.36	0.39	0.32	0.17	2.59	0.05
	54	Tsararano	43	0.38	0.39	0.36	0.07*	3.76	0.05
	55	Vohimasina	22	0.40	0.41	0.38	0.09*	3.29	0.07
West	63	Androvabe	11	0.47	0.50	0.43	0.15	3.24	0.07
South-West	66	Toliary	30	0.39	0.39	0.33	0.15*	3.88	0.06
	67	Bezaha	23	0.42	0.43	0.42	0.03	3.47	0.02
South	68	Mahatalaky	17	0.44	0.45	0.41	0.10	3.47	0.06
	70	Ifarantsy	10	0.35	0.37	0.35	0.07	2.53	0.03
	71	Ifarantsy	16	0.39	0.40	0.38	0.04	3.24	0.04
	72	Ampasy N.	10	0.42	0.45	0.39	0.13	3.12	0.05
	74	Soanierana	21	0.40	0.41	0.38	0.05	3.47	0.06
	75	Ankaramena	13	0.35	0.36	0.36	0.03	2.71	0.05
	76	Ambovombe	15	0.42	0.44	0.39	0.09	3.35	0.04

The analysis of molecular variance showed that the main contribution to the genetic variance was variation within sites (94 %). Despite being much lower, differences among regions (2.3 %) and among sites within regions (3.34 %) contributed significantly to the total genetic variation (SD Table 3).

Supplementary data Table 3. Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) determining the proportion of genetic variation partitioned among the 6 geographical regions containing at least two sites with more than 10 individuals, among sites within regions and within regions.

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of square	Variance component	Percentage of variation	Fixation indices
Between geographical regions	5	86.575	0.081	2.33	F_{CT} 0.023***
Among sites within regions	24	151.004	0.116	3.34	F_{SC} 0.034***
Within sites	944	2776.455	3.261	94.33	F_{ST} 0.057***
	973	3014.033	3.457	100	

Although not presented, when all regions were taken into account (including North and East region with only one site sampled) results were similar, with all hierarchical levels accounting for a significant part of the genetic diversity. Variation in allelic composition was highlighted by the Bayesian Markov assignment in the Structure software. The probability of $K = 2$ was the most strongly supported in likelihood value ($\Delta k = 158.14$) (SD Fig.1, Fig.1). Under the $K = 2$ population clustering assumption, a geographic structuring appears with populations from the North, North-West and South together in cluster 1 opposed to populations from the West and East (cluster 2). The Highland populations were mostly a mix of two genetic clusters (Fig. 1, Fig. 3, $K = 2$).

1 **Supplementary Table 4.** Pairwise F_{ST} estimates values between pairs of 32 sites (Weir and Cockerham (1984). Significant P -value (5%) are in bold and highlighted in grey.

	North	North -East			North-West			High-Plateau											High-Plateau - South				West	South-West			South							
site	2	11	13	15	20	21	22	34	35	36	37	38	40	42	43	47	49	50	52	53	54	55	63	66	67	68	70	71	72	74	75			
11	0.02																																	
13	0.03	0.03																																
15	0.01	0.01	0.01																															
20	0.05	0.03	0.07	0.03																														
21	0.03	0.02	0.05	0.05	0.03																													
22	0.04	0.02	0.05	0.03	-0.02	0.01																												
34	0.04	0.01	0.02	0.02	0.02	0.05	0.01																											
35	0.03	0.02	0.06	0.03	0.02	0.07	0.02	0.02																										
36	0.04	0.01	0.06	0.04	0.05	0.06	0.06	0.03	0.04																									
37	0.04	0.05	0.08	0.05	0.03	0.08	0.03	0.02	-0.02	0.05																								
38	0.04	0.01	0.03	0.02	0.05	0.02	0.03	0.00	0.04	0.01	0.05																							
40	0.10	0.08	0.12	0.11	0.11	0.12	0.07	0.08	0.07	0.08	0.06	0.11																						
42	0.02	0.00	0.04	0.01	0.01	0.01	0.00	-0.01	0.02	0.00	0.01	-0.02	0.08																					
43	0.06	0.02	0.05	0.03	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.06	0.06	0.03	0.13	0.04																				
47	0.03	0.02	0.04	0.02	0.05	0.04	0.05	0.03	0.06	0.03	0.08	0.02	0.12	0.01	0.04																			
49	0.04	0.02	0.06	0.01	0.07	0.03	0.04	0.05	0.07	0.05	0.10	0.03	0.10	0.02	0.05	0.01																		
50	0.07	0.04	0.09	0.08	0.07	0.06	0.09	0.07	0.08	0.07	0.11	0.05	0.17	0.07	0.07	0.08	0.12																	
52	0.10	0.05	0.12	0.13	0.11	0.13	0.09	0.05	0.08	0.07	0.07	0.08	0.07	0.03	0.12	0.13	0.13	0.16																
53	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.03	-0.01	-0.02	0.00	0.02	0.00	0.03	0.08	-0.02	0.04	0.04	0.05	0.07	0.04	0.01														
54	0.11	0.05	0.07	0.09	0.08	0.12	0.08	0.03	0.07	0.08	0.06	0.07	0.11	0.03	0.10	0.13	0.14	0.14	0.01	0.01														
55	0.09	0.04	0.08	0.08	0.06	0.11	0.06	0.02	0.04	0.07	0.04	0.07	0.08	0.02	0.09	0.11	0.12	0.13	0.00	0.00	-0.01													
63	0.12	0.08	0.14	0.13	0.11	0.12	0.09	0.08	0.13	0.10	0.10	0.10	0.12	0.05	0.16	0.15	0.15	0.17	0.02	0.06	0.07	0.06												
66	0.02	0.01	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.04	0.03	0.06	0.01	0.13	0.02	0.03	0.05	0.05	0.03	0.13	0.01	0.09	0.09	0.15											
67	0.04	0.02	0.05	0.04	0.01	0.05	0.03	0.01	0.03	0.03	0.04	0.03	0.11	0.00	0.06	0.05	0.07	0.07	0.08	0.00	0.05	0.05	0.10	0.02										
68	0.02	0.00	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00	0.03	0.02	0.04	0.00	0.09	-0.01	0.04	0.02	0.04	0.04	0.05	-0.01	0.05	0.04	0.07	0.01	0.01									
70	0.03	0.02	0.03	0.01	0.02	0.04	0.01	0.01	0.01	0.04	0.04	0.03	0.11	0.00	0.04	0.04	0.07	0.09	0.10	-0.02	0.08	0.05	0.11	0.02	0.04	0.00								
71	0.01	0.00	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.03	0.01	0.05	0.02	0.10	0.00	0.05	0.02	0.03	0.05	0.10	-0.02	0.08	0.07	0.13	0.01	0.01	0.00	0.01							
72	0.04	0.01	0.02	0.02	0.04	0.05	0.03	-0.01	0.03	0.01	0.04	0.01	0.08	-0.02	0.06	0.05	0.07	0.10	0.04	-0.02	0.02	0.02	0.05	0.03	0.03	-0.01	-0.02	0.02						
74	0.03	0.01	0.01	0.02	0.03	0.02	0.03	0.02	0.04	0.03	0.07	0.01	0.12	0.00	0.03	0.03	0.05	0.05	0.11	0.01	0.08	0.08	0.14	0.01	0.03	0.00	0.01	0.00	0.01					
75	0.03	0.01	0.03	0.02	0.01	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.04	0.01	0.12	0.00	0.02	0.04	0.08	0.03	0.08	0.01	0.06	0.05	0.12	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01	0.03	-0.01				
76	0.03	0.01	0.02	0.02	0.03	-0.01	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.01	0.11	0.01	0.02	0.01	0.03	0.06	0.12	0.03	0.11	0.09	0.12	0.02	0.04	0.00	0.02	0.01	0.03	0.01	0.01			

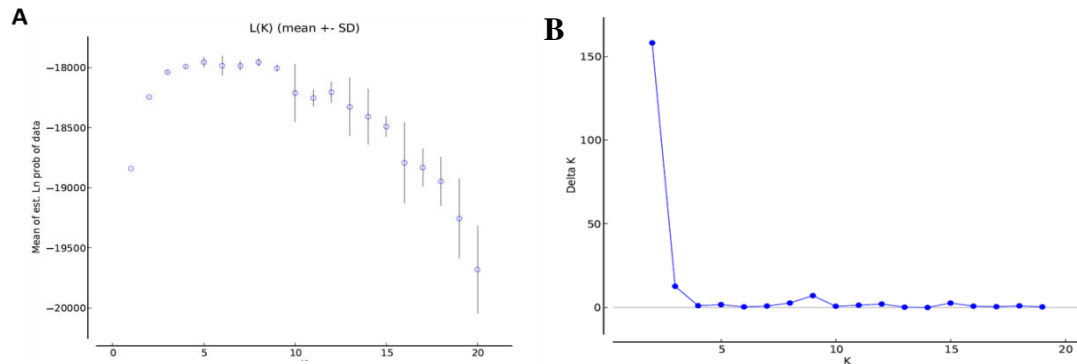


Figure supplementary data Fig. 1: **A.** absolute values of the likelihood distribution (mean±SD) calculated according to the formula: $|L''(K)| = |L'(K+1) - L'(K)|$ (Evanno et al. 2005), implemented in Structure Harvester on the web, **B.** delta K calculated as $(\Delta k) = m|L''(K)|/s[L(K)]$ according to Evanno et al. (2005). The modal value of this distribution is the $k=2$.

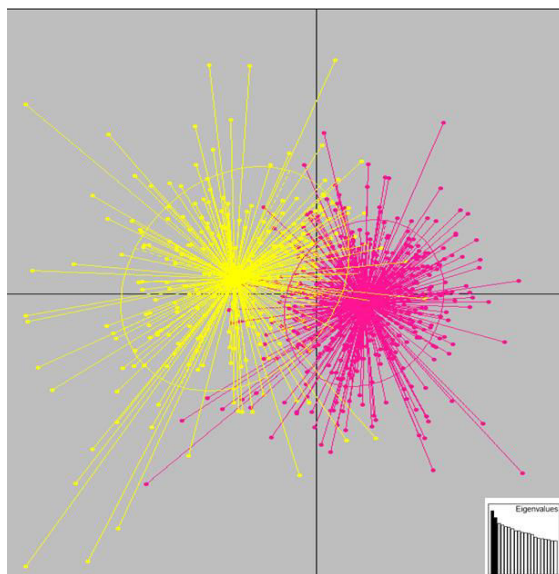


Figure 3. Principal Component Analysis Scatter plot, each colour representing a genetic cluster obtained by Structure (assuming $K=2$ genetic clusters), the bar graph displays the variance explained by the 2 discriminant eigenvalues used for plotting.

PCR-RFLP patterns and sequence

After analysis of the 884 samples, 867 were successfully amplified and digested. Three different PCR-RFLP profiles were detected. Two restriction profiles were congruent with ones already published. The dominant PCR-RFLP profile observed was the African A1 haplotype (99.59 %), which exhibited 3 lengths of fragments (47, 108 and 483 pb) (Franck et al., 2001). Another PCR-RFLP profile referred to as the A4 haplotype (47, 108, 192 and 483 pb) was found in 3 individuals in our sample, two from S 66 and one from S 23. Another notable profile was found in one individual from S 29 (47, 108, 150, 350 pb). The total sizes of each haplotype ranged from 638 pb for A1, 830 pb for A4 and 658 pb for the new haplotype.

Supplementary data Table 5. Description of the 18 mitochondrial haplotypes obtained from *A. m. unicolor*. For each haplotype are indicated: code, accession number, number of samples per haplotype and distribution among geographical region S(). Distribution of mitochondrial haplotypes detected from *A. m. unicolor* from Madagascar, n= number of samples per haplotype.

Names	Accession number	N	North S1-10	North- East S11-18	North West S20-23	East S24-29; S65	Hauts Plateaux S30-55	West S56-64	South- west S66-67	South S68-76
A1_Mad1	KF976992	17				S65 (2)	S31 (5) S32 (6) S35 (1) S39 (2) S41 (1)			
A1_Mad2	KF976993	19					S32 (4) S35 (4) S38 (5) S39 (3) S41 (3)			
A1_Mad3	KF976994	124	S2 (1) S3 (3) S4 (3) S7 (2) S8 (2) S9 (2) S10 (1)	S15 (9) S19 (3)	S20/21(10) S22 (2) S22 (2) S23 (2)	S24 (6) S25 (3) S28 (4) S29 (1) S65 (4)	S19 (3) S31 (4) S32 (2) S34 (1) S35 (1) S36 (1) S37 (3) S38 (1) S40 (8) S41 (2) S42 (3) S43 (4) S44 (2) S45 (3) S48 (3) S49 (4) S50 (2)	S57 (1) S60 (3)	S66 (7)	S73 (2) S74 (2) S75 (2)
A1_Mad4	KF976995	1					S19 (1)			
A1_Mad5	KF976996	2	S4 (1)	S18 (1)						
A1_Mad6	KF976997	1	S9 (1)							
A1_Mad7	KF976998	1		S18 (1)						
A1_Mad8	KF976999	1		S16 (1)						
A1_Mad9	KF977000	2	S4 (1)				S52 (1)			
A1_Mad10	KF977001	3	S7 (2)		S22 (1)					
A1_Mad11	KF977002	1					S41 (1)			
A1_Mad12	KF977003	1							S66 (1)	
A1_Mad13	KF977004	2			S22 (1)	S29 (1)				
A1_Mad14	KF977005	1					S44 (1)			
A1_Mad15	KF977006	2	S4 (1)	S16 (1)						
A1_Mad16	KF977007	1								S73 (1)
A4_Mad1	KF977008	1							S66 (1)	
A4_Mad2	KF977009	1			S23 (1)					
Total		181	6 haplo (20)	6 haplo (17)	3 haplo (9)	3 haplo (21)	7 haplo (86)	1 haplo (4)	3 haplo (9)	2 haplo (7)

Discussion

Previous PCR-RFLP analyses performed on 48 individuals from Madagascar by several authors (Garnery et al., 1992; Franck et al., 2001) detected a single restriction profile (A1). The larger sampling scale of this study detected a new A1 restriction profile and the occurrence of an A4 restriction profile. The sequencing approach used in our study revealed mtDNA variability with 14 new sequences. Haplotype frequencies and network analyses suggested that divergences are quite recent (SD Fig. 2), with all A1 sequences diverging from the predominant one through one single mutation (except for A1Mad_12). The A1 haplotype is widespread. It has been reported in Morocco (De la Rua et al. 2006), Algeria (Chahbar et al., 2013) and in Sudan (El-Niweiri and Moritz, 2008). It was also recorded in the Middle East (Alburaki et al. 2011). Three samples from A4 were found in the Western region of Madagascar. Two of these samples show high genetic diversity with A4 sequences. This might result from historical introductions to the island, as haplotype A4, typical of *A. m. scutellata* (Ruttner, 1988) are observed in the dry savannahs of East Africa.

The absence of haplotypes in our study belonging to other lineages implies that introductions of foreign queens are rare. This can be explained by the fact that other subspecies i) are not well adapted to this environment (climate and specific endemic vegetation) or ii) are not selected by traditional Malagasy beekeepers, *A. m. unicolor* being easy to handle compared to other much more aggressive subspecies like the Africanized honeybee (Ruttner, 1988; Winston, 1992).

Apis mellifera unicolor has a poor allelic diversity in terms of number of alleles for each population marker ($N_{br} = 2.47$ to 3.88), in comparison with other studies performed on African honeybee populations where allelic diversity ranged from 7.9 (*A. m. capensis*) to 9 (*A. m. intermissa*) and even 11 (*A. m. scutellata*) (for 7 to 12 microsatellite loci, with most loci being the same in both studies) (Estoup et al., 1995).

The levels of heterozygosity observed in Malagasy populations were also much lower than those reported from African populations. Across the 32 populations studied over the 17 microsatellite loci, levels varied from 0.34 to 0.47 (H_e) while the average expected heterozygosities ranged between 0.78 and 0.90 (*A. m. intermissa* to *A. m. scutellata*) (Franck et al., 2001). In parallel, the lowest levels ranged from 0.26 to 0.66 in west Mediterranean subspecies (*A. m. iberiensis* and *A. m. siciliana*, respectively) (Garnery et al., 1998).

High levels of nuclear polymorphism in African populations have been explained by i) larger effective population size (Estoup et al., 1995), allowing more alleles to be maintained, and ii) the high migratory behavior of colonies which is typical for African honeybees south of the Sahara (Hepburn and Radloff, 1998; Jaffe et al., 2009). Allelic richness within populations can also be increased by introgression of foreign genes into zones with other subspecies. Due to the lack of data on the biology of the Malagasy subspecies, it is difficult to compare effective population size of *A. m. unicolor* to other subspecies. However, its insular situation prevents frequent natural introductions and may in part explain the low nuclear polymorphism. Both the significant pairwise F_{ST} values observed between neighbouring sites (i.e. S34-S35 only 10 km apart, SD Table 3) and the significant isolation by distance patterns

observed among sites 500 km apart (Fig.1, Fig. 2) suggest that gene flow is restricted. The larger variance of F_{ST} at longer distances (>500 km, Fig. 2. d) indicates that at the island scale, the influence of genetic drift is strong relative to gene flow (Hutchison and Templeton, 1999) and that problems of homoplasy could be more important (Jarne et al., 1996). As observed in *A. m. capensis* from South-Africa, *A. m. unicolor* populations may be less mobile than other African subspecies (Estoup et al., 1995) because of the topography of the island (coastal v. Hauts Plateaux areas) and the climatic variations between regions. Indeed this was underlined with the results of Structure indicating genetic sub-clustering of the observed populations into at least two major clusters. We were not able to link the observed genetic sub-clustering to the two described honeybee ecotypes of Ruttner (Ruttner, 1988). Furthermore, we found such an admixture of genetic clusters between populations from different regions and the region surrounding the capital (on the Hauts Plateaux) that those ecotypes might have been mixed in the recent past. Indeed, in Madagascar, most goods pass through the capital, central market and free commercial exchanges, which facilitates honeybee movement. Transport routes around the island are limited but all of them lead to the capital.

The recent arrival of *V. destructor* in two regions of Madagascar (Antananarivo, Hauts Plateaux and Toamasina, East coast), with an increasing range every year has resulted in alarming rates of colony loss (up to 60% in the Hauts Plateaux) (Rasolofoarivao et al., 2013). Infested honeybee populations have not yet exhibited lower allelic richness or heterozygosity levels than non-infested ones (data not shown). This fact is probably due to the very recent arrival of the mite on the island.

Wild populations, uninfluenced by beekeeping, exist in many regions of Africa and honeybees from natural habitats have been shown to have a higher genetic diversity than managed populations (Allsopp, 2004), so more intensive studies of wild colonies in protected and wild zones of Madagascar would be interesting to confirm or not our findings on the genetic diversity of *A. m. unicolor*.

The relatively low mitochondrial and nuclear genetic diversity found on *A. m. unicolor* in Madagascar, compared to other subspecies of the A lineage (Estoup et al., 1995; Franck et al., 1998; Franck et al., 2001); plus the hypothesis of an A lineage split from other lineages (6 million years ago) with *A. m. unicolor* divergence from other subspecies (1 million years ago) (Han et al., 2012); and the prehistoric breakup of the supercontinent Gondwana which separated Madagascar from mainland Africa (around 135 million years ago) (Rabinowitz et al., 1983), point to the fact that *A. m. unicolor* might derive from a recent (in geological time) colonization event of this continental island. Nevertheless, its morphological (two ecotypes) and behavioral differences from other African honeybees (one of the sweetest honeybees in the world (Ruttner, 1988)), suggests that recent settlers, such as the flora of the island, seem to have evolved in relative isolation. Furthermore, the low genetic diversity observed, if confirmed in wild and conserved areas, might also be the result of over 1400 years of high deforestation rates and habitat fragmentation on the island (Campbell, 1993; Gade, 1996) which has been increasing over the last 50 years (Harper et al., 2007).

Acknowledgments

We thank Ravelomanana A. for mapping sites with GIS and Simiand C. for technical help in the laboratory. We thank the following people for their help with data collection: Porphyre V. (and QUALIREG networking), Borsa C., Mandirola V., Andrianaivoariseta N., Razafindrazaka D., Cattel J., Chesnais Q., ADEFA and FENAM. We are grateful to the Malagasy beekeepers who participated in the study. We would like to thank Garnery L. for the fruitful discussions related to those genetic results. This work is part of the PhD of Rasolofoarivao H. recipient of a grant of CIRAD-AIRD-Sud. Field work had been partly funded by CIRAD, the Enlargement and sustainability of the Plant Protection Network supported by the European Union, the French government, the Région Réunion and the Département de la Réunion.

References

- Alburaki M., Moulin S., Legout H., Alburaki A., Garnery L. (2011) Mitochondrial structure of eastern honeybee populations from Syria, Lebanon and Iraq, *Apidologie* 42, 628-641.
- Alburaki M., Bertrand B., Legout H., Moulin S., Alburaki A., Sheppard W.S., Garnery L. (2013) A fifth major genetic group among honeybees revealed in Syria, *BMC Genet.* 14(1), 117.
- Allsopp M.H. (2004) Cape honeybee (*Apis mellifera capensis* Eschscholtz) and Varroa mite (*Varroa destructor* Anderson & Trueman) threats to honeybees and beekeeping in Africa, *Int. J. Trop. Insect Sci.* 24, 87-94.
- Batra S. (1995) Bees and pollination in our changing environment, *Apidologie* 26, 361-361.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. (1996) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR 5000, 1996-2004.
- Campbell G. (1993) The Structure of Trade in Madagascar, *The Int. Journal of Afr. Hist. Stud.* 26, 111-148.
- Chapuis M.-P., Estoup A. (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation, *Mol. Biol. and Evol.* 24(3), 621-631.
- Chahbar N., Muñoz I. , Dall'Olio R., De la Rua P., Serrano J., Doumandji S. (2013) Population structure of north african honeybees is influenced by both biological and anthropogenic factors, *Journal of Insect Conserv.* 17, 385-392.
- Clement M., Posada D., Crandall K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies, *Mol. Ecol.* 9(10), 1657-1659.
- De la Rua P., Galian J. Pedersen B. V., Serrano J. (2006) Molecular characterization and population structure of *Apis mellifera* from Madeira and the Azores, *Apidologie* 37, 699-708.
- De la Rua P., Jaffe R., Dall'Olio R., Munoz I., Serrano J. (2009) Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees, *Apidologie* 40(3), 263-284.
- Delatte H., Virgilio M., Simiand C., Risterucci A.M., DeMeyer M., Quilici S. (2010) Isolation and characterization of microsatellite markers from *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett), *Mol. Ecol. Resour.* 10, 576-579.
- El-Niweiri M. A., Moritz R. F. (2008) Mitochondrial discrimination of honeybees (*Apis mellifera*) of Sudan, *Apidologie* 39, 566-573.
- Eschscholtz J.F. (1822) *Entomographien: Erste Lieferung.* Gedruckt und verlegt bei G. Reimer 42 p.

- Estoup A., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.M. (1995) Microsatellite Variation in Honey Bee (*Apis-Mellifera* L) Populations - Hierarchical Genetic-Structure and Test of the Infinite Allele and Stepwise Mutation Models, *Genetics* 140(2), 679-695.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study, *Mol. Ecol.* 14(8), 2611-2620.
- Excoffier L., Lischer H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows, *Mol. Ecol. Resour.* 10(3), 564-567.
- Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.M. (1998) The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data, *Evolution* 52(4), 1119-1134.
- Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.M. (2000) Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie* 31(2), 167-180.
- Franck P., Garnery L., Loiseau A., Oldroyd B.P., Hepburn H.R., Solignac M., Cornuet J.M. (2001) Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data, *Heredity* 86, 420-430.
- Gade D.W. (1996) Deforestation and its effects in highland Madagascar, *Mt. Res. and Dev.*, 101-116.
- Ganzhorn J.U., Lowry II P.P., Schatz G.E., Sommer S. (2001) The biodiversity of Madagascar: one of the world's hottest hotspots on its way out, *Oryx* 35(4), 346-348.
- Garnery L., Cornuet J.M., Solignac M. (1992) Evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis, *Mol. Ecol.* 1(3), 145-154.
- Garnery L., Solignac M., Celebrano G., Cornuet J.M. (1993) A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L, *Experientia* 49(11), 1016-1021.
- Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J.-M., Solignac M. (1998) Genetic diversity of the west European honeybee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) I. Mitochondrial DNA, *Gen. Sel. Evol.* 30(Supplement), S31-S47.
- Goudet J. (2001) Fstat, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices Version 2.9.3., Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Han F., Wallberg A., Webster M.T. (2012) From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate?, *Ecol. Evol.* 2(8), 1949-1957.
- Harper G.J., Steininger M.K., Tucker C.J., Juhn D., Hawkins F. (2007) Fifty years of deforestation and forest fragmentation in Madagascar, *Environ. Conserv.* 34(4), 325.

Hepburn H., Radloff S. (1998) Honeybees of Africa, Springer, Berlin, Heidelberg, New York 379 p.

Hutchison D.W., Templeton A.R. (1999) Correlation of pairwise genetic and geographic distance measure: inferring the relative influences of gene flow and drift on distribution of genetic variability, *Evolution* 53, 1898-1914.

Jaffe R., Dietemann V., Crewe R.M., Moritz R.F.A. (2009) Temporal variation in the genetic structure of a drone congregation area: an insight into the population dynamics of wild African honeybees (*Apis mellifera scutellata*), *Mol. ecol.* 18(7), 1511-1522.

Jakobsson M., Rosenberg N.A. (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure, *Bioinformatics* 23(14), 1801-1806.

Jarne P., Lagoda P. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back, *Trends in Ecol. & Evol.* 11(10), 424-429.

Jombart T. (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers, *Bioinformatics* 24(11), 1403-1405.

Klein A.M., Vaissiere B.E., Cane J.H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C., Tscharntke T. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops, *Proceedings of the Royal Society B: Biol. Sci.* 274(1608), 303.

Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K. (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences, *Brief. in Bioinform.* 9(4), 299-306.

Latreille P.A. (1804) Notice des espèces d'abeilles vivant en grande société, ou abeilles proprement dites, et description d'espèces nouvelles, *Ann. Mus. Natl. Hist. Nat.* 5, 161-178.

Lepeletier A. (1836) Histoire Naturelle des insectes. suites à Buffon. Hyménoptères. Roret, Paris.

Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., Da Fonseca G.A., Kent J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities, *Nature* 403(6772), 853-858.

Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics* 155(2), 945-959.

Rabinowitz P.D., Coffin M.F., Falvey D. (1983) The separation of Madagascar and Africa, *Science* 220, 67-69.

Ralalaharisoa-Ramamonjisoa Z., Ralimananai H., Lobreau-Callen D. (1996) Comportement de butinage d'*Apis mellifera* var *Unicolor* (HYMENOPTERA, APIDAE) dans divers biotopes, *Biogéographie de Madag.*, 517-522.

Rasolofoarivao H., Clemencet J., Raveloson-Ravaomanarivo L.H., Razafindrazaka D., Reynaud B., Delatte H. (2013) Spread and strain determination of *Varroa destructor* (Acari:

- Varroidea) in Madagascar since its first description in 2010, *Exp. and Appl. Acarol.* 60(4), 521-530.
- Rosenberg N.A. (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure, *Mol. Ecol. Notes* 4(1), 137-138.
- Rousset F. (2008) Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux, *Mol. Ecol. Ressour.* 8, 103-106.
- Ruttner F. (1975) Races of bees. The Hive and the Honeybee, 19-38.
- Ruttner F., Tassencourt I., Louveaux J. (1978) Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L, *Apidologie* 9, 363-381.
- Ruttner F. (1988) Biogeography and taxonomy of honeybees, Ed. Springer-Verlag: 284.
- Sheppard W., Arias M., Grech A., Meixner M. (1997) *Apis mellifera ruttneri*, a new honeybee subspecies from Malta, *Apidologie* 28(5), 287-293.
- Sheppard W.S., Meixner M.D. (2003) *Apis mellifera pomonella*, a new honeybee subspecies from Central Asia, *Apidologie* 34(4), 367-376.
- Solignac M., Vautrin D., Loiseau A., Mougél F., Baudry E., Estoup A., Garnery L., et al. (2003) Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome, *Mol. Ecol. Notes* 3(2), 307-311.
- Team R.D.C. (2005) R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Weir B.S., Cockerham C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure, *Evolution*: 1358-1370.
- Whitfield C.W., Behura S.K., Berlocher S.H., Clark A.G., Johnston J.S., Sheppard W.S., Smith D.R., et al. (2006) Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honeybee, *Apis mellifera*, *Science* 314(5799), 642-645.
- Winston M. (1992) Killer bees. The Africanized honeybee in the Americas, Harvard University Press 162.

CHAPITRE II

Dispersion et détermination de la souche de *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) à Madagascar depuis sa première description en 2010

Henriette Rasolofoarivao, Johanna Clémencet, Lala Harivalo Raveloson Ravaomanarivo, Dimby Razafindrazaka, Bernard Reynaud, Hélène Delatte

Ce chapitre a été publié dans le journal *Experimental and Applied Acarology* en 2013.

Résumé

Varroa destructor est un véritable fléau de l'apiculture mondiale. Il a été détecté pour la première fois à Madagascar en 2010 sur l'abeille endémique *Apis mellifera unicolor*. Pour évaluer l'avancée du *V. destructor* à travers l'île après sa première description, des surveillances généralisées des colonies ont été menées en 2011-2012; un total de 695 colonies localisées dans 119 sites issus de 30 districts a été inspecté. Deux ans après son introduction, neuf districts ont été trouvés infestés. La propagation du *V. destructor* a été relativement lente en comparaison avec celles observées dans les pays africains et a été estimée à environ 40 km par an, les cinq districts nouvellement infestés en 2012 étant voisins des premiers touchés. Afin d'évaluer l'incidence de l'infestation par les acariens, un total de 73 colonies de 5 ruchers a été suivi pendant 1 an (2011-2012). Soixante pour cent de perte des colonies ont été observés au bout d'une année. Treize acariens femelles provenant de 8 sites infestés ont été utilisés pour l'analyse génétique mitochondriale (séquençage du gène Cytochrome Oxydase I (COI)). L'haplotype coréen (K1) a été le seul détecté; il est identique à la lignée la plus répandue au monde et également présent en Afrique. Chaque colonie domestique a été aussi soigneusement examinée afin de détecter d'autres insectes pathogènes de la ruche. La grande fausse teigne *Galleria mellonella* a été trouvée dans toutes les colonies échantillonnées. Deux autres agents pathogènes et des anomalies morphologiques des ouvrières, telles que les ailes déformées, ont été trouvés associées à la présence de *V. destructor*. Un programme de prévention devrait être mis en place pour éviter la dispersion des acariens dans toute l'île.

Mots clés : *Varroa destructor*, *Apis mellifera unicolor*, Madagascar, ADN mitochondrial.

Spread and strain determination of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in Madagascar since its first report in 2010

Henriette Rasolofoarivao^{1,2}, Johanna Clémencet³, Lala Harivalo Raveloson Ravaomanarivo², Dimby Razafindrazaka², Bernard Reynaud¹, Hélène Delatte¹✉

¹CIRAD, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France; ²Département d'Entomologie, Faculté de Sciences B.P. 906, Université d'Antananarivo, Antananarivo 101, Madagascar; ³Université de La Réunion, UMR PVBMT F-97715 Saint Denis cedex 9, La Réunion, France

Abstract

Varroa destructor is a major pest in world beekeeping. It was first detected in Madagascar in 2010 on the endemic honeybee *Apis mellifera unicolor*. To evaluate *V. destructor* spread dynamics in Madagascar a global survey was conducted in 2011-2012. A total of 695 colonies from 30 districts were inspected for the presence of mites. Two years after its introduction, nine districts were found infested. *Varroa destructor* spread was relatively slow compared to other countries with a maximum progression of 40 km per year, the five newly infested districts being located next to the first infested ones. The incidence of mite infestation was also investigated by monitoring 73 colonies from five apiaries during one year (2011-2012). Sixty percent of local colony mortality was recorded after one year of survey. *Varroa destructor* strain determination was done by partial sequencing of the cytochrome oxidase I gene of 13 phoretic mites sampled in five districts. A single *V. destructor* mitochondrial haplotype was detected, the Korean type, also present in the closest African countries. A global pathogen survey was also conducted on the colonies inspected for mite presence. The greater wax moth, *Galleria mellonella* has been found in all colonies all over the country. Two other pathogens and morphological abnormalities in workers, such as deformed wings, were found associated with only *V. destructor* presence. A prevention management plan must be implemented to delimit mite spread across the island.

Key words: *Varroa destructor*, *Apis mellifera unicolor*, Madagascar, mitochondrial DNA.

Introduction

The ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), has emerged as the most devastating pest of domestic honey bees (*Apis mellifera*) worldwide (Anderson and Trueman 2000). The presence of *V. destructor* in Africa, considered as the origin of *A. mellifera* (Whitfield et al. 2006), raises specific concerns. Africa is indeed the only area in the world with a large natural population (Dietemann et al. 2009). In sub-Saharan Africa, beekeeping is mostly based on swarms trapped from the wild, and therefore uses only a small part of the wild populations (Dietemann et al. 2009). Spread of *V. destructor* is not only a threat for health and survival of managed colonies, but also for feral honeybee populations that pollinate 40-70% of indigenous plants (Allsopp 2004). The presence of *V. destructor* in sub-Saharan Africa was first recorded in South Africa in 1997 on both *A. mellifera capensis* and *A. m. scutellata* subspecies (Allsopp 1997). In 2009, *V. destructor* has been detected in several East African countries (Kenya, Tanzania, Uganda) and it recently also invaded parts of West Africa (Fazier et al. 2010).

Varroa destructor has recently been detected in Madagascar (OIE notification, 11 February 2010), the fourth-largest island in the world, located in the South West Indian Ocean (). On this continental tropical island (400 km off the East coast of Africa), only one honeybee race is described: the endemic subspecies *A. m. unicolor* (Latreille). As *A. m. capensis* and *A. m. scutella*, *A. m. unicolor* belongs to the African evolutive lineage A (Franck et al. 2001). Arrival of *V. destructor* is particularly concerning in Madagascar because of the importance of honeybees in the pollination of both endemic and commercial crops. Indeed, Madagascar is a hotspot country of biodiversity with 80% of phanerogam endemic plants (Ganzhorn et al. 2001). A previous report has shown that *A. m. unicolor* is present in endemic as well as cultivated zones on the whole island, and could be crucial for pollination of its flora as it is able to collect pollen on these plants (Ralalaharisoa-Ramamonjisoa et al. 1996). Some tropical crops mainly rely on honeybees for pollination, such as lychee (Stern and Gazit 1996), which is extensively cultured on the east coast of the island. Furthermore, colony losses could have dramatic economic impacts on small-scale beekeepers in Madagascar.

The first mite diagnostic study done by the malagasy breeding ministry in February 2010 identified *V. destructor* in honeybee colonies from two regions 400 km apart: the Analamanga region on the highlands (three districts infested) and the Analanjirofo region on the east coast (one district infested). Purposes of the present study were (1) to evaluate the dynamics of *V. destructor* spread in Madagascar after its first report, (2) to evaluate its damage on honeybee colonies over one year on targeted apiaries, (3) to identify pathogens or worker morphological abnormalities potentially associated with *V. destructor*, and (4) to identify mitochondrial haplotype profiles of *V. destructor* isolates from infested Madagascar areas.

Materials and methods

Two types of monitoring studies were carried out: one global survey over Madagascar for the presence of *V. destructor* and a local study to monitor the incidence of mite infestation in colonies over a year.

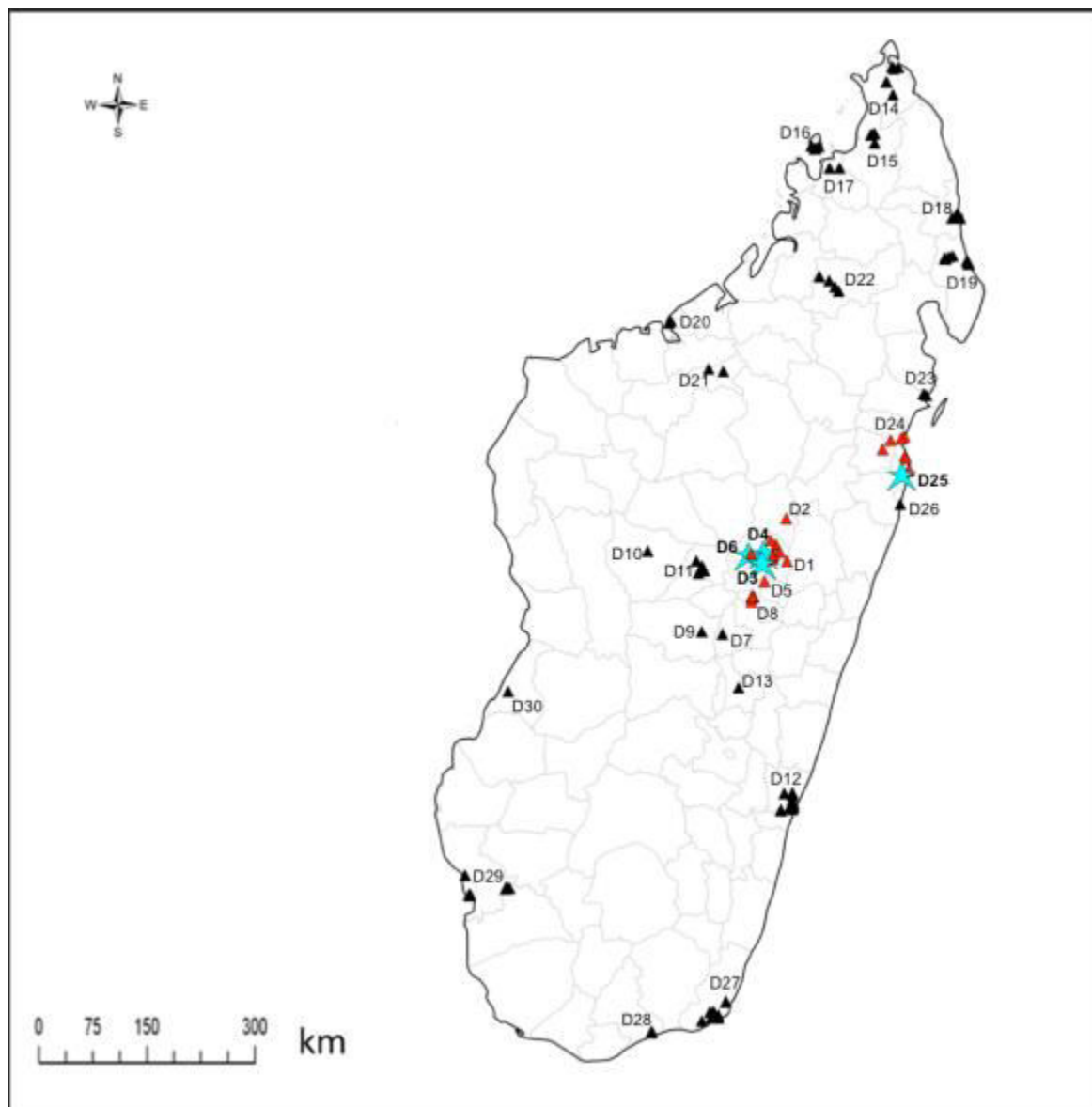


Figure 1: Spread map of *Varroa destructor* in Madagascar in 2011-2012: ▲: non infested sites; ▲ infested sites; ★ sites already infested in 2010 (D.S.V., 2010)

Global survey over Madagascar

The survey was carried out between August 2011 and February 2012 in various geographical areas of Madagascar (Fig 1, Supplementary Table S1). The precise location of each sample site was made explicit to determine whether infested colonies congregated in predictable locations. Geographical coordinates were taken by GPS (Global Positioning System) Etrex garming and are available upon request. Recent history of all colonies was also noted, if

known, as well as breeding characteristics. Other parasitic insects inside the hives as well as worker morphological abnormalities of infested colonies were monitored.

Both feral and managed colonies were examined for the presence of mites. When present, phoretic mites were collected from honeybee workers sampled from infested colonies. In the laboratory mites were separated from abdominal segments or body regions of the honeybee and stored separately in a tube with 96% ethanol at -20°C until needed for further analysis.

Monitoring of managed colonies in the first mite-infested area over 1 year

In January 2011, a first survey to monitor the incidence of mite infestation in colonies over a year was conducted in the Analamanga region (first-infested region). A total of 73 colonies from five sites in four districts were surveyed. All monitored hives were in Langstroth style with frames. Hives were numbered in order to recognize them. Local beekeepers treated infested colonies with thyme essential oil 2-3 times a year. One year later, in January 2012, the number of colonies that survived the infestation in each site was recorded.

DNA extraction, amplification, sequencing

Thirteen mites from eight infested sites from five districts were used to carry out molecular analyses. Total DNA was extracted from each individual female mite using the method adapted by Delatte et al. (2010). Extracted DNA was stored at -20°C .

Varroa destructor strain determination was performed by partial sequencing of the cytochrome oxidase I (COI) gene. Primers COXF (5'GGRGGWGAYATTYAWTATCAAC) and COXR (5'GGWGACCTGTWAATAGCAAATAC) developed by Anderson and Fuchs (1998) were used to amplify the extracted DNA. Final mix of 15 μl contained 7.5 μl of type-it 2X buffer (Qiagen), 3 μl per primer (at 20 pmol/ μl), and 1.5 μl of extracted DNA. PCR (Polymerase Chain Reaction) cycling conditions were the following: initial denaturation for 5 min at 94°C followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 40°C for 80 s and a final elongation step at 72°C for 2 min and 10 min extension 72°C , was applied.

Supplementary data Table 1: Global *Varroa destructor* survey conducted in 2011- 2012 over 16 regions of Madagascar. For each district are given: the total number of sites and colonies inspected; the colony type (M: managed; MT: managed and transported; F: feral); prevalence of *Varroa destructor* and presence of other parasites or worker abnormalities observed (*Gm*: *Galleria mellonella*, *Aa*: *Acherontia atropos*, *At*: *Aethina tumida* and *DW*: *deformed wings*).

Regions (R)	Districts (D)	Number of sites (colonies)	Colony type	<i>V. destructor</i> infested site rates	Presence of parasites and worker abnormalities
R1: Analamanga (H.P.)	D1: Manjakandriana	9 (89)	MT	100	<i>Gm</i> / <i>Aa</i> / <i>At</i> / <i>DW</i>
	D2: Anjozorobe	1 (9)	MT	100	<i>Gm</i> / <i>Aa</i> / <i>At</i> / <i>DW</i>
	D3: Antananarivo A	1 (5)	M (?)	100*	<i>Gm</i>
	D4: Ambohidratrimo	2 (30)	M (?)	100*	<i>Gm</i> / <i>DW</i>
	D5: Andramasina	2 (10)	M (?)	100	<i>Gm</i>
	D6: Antananarivo R	1 (2)	MT	100*	<i>Gm</i>
R2: Vakinankaratra (H.P.)	D7: Antsirabe	1 (9)	MT	0	<i>Gm</i>
	D8: Ambatolampy	5 (39)	M	40	<i>Gm</i>
	D9: Betafo	1 (9)	M	0	<i>Gm</i>
R3: Bongolava (H.P.)	D10: Tsiroanomandidy	2 (6)	M	0	<i>Gm</i>
R4: Itasy (H.P.)	D11: Soavinandriana I.	4 (33)	M	0	<i>Gm</i>
R5: Vatovavy F. (H.P.)	D12: Manakara	11 (13)	M	0	<i>Gm</i>
R6: Amoron'i M. (H.P.)	D13: Ambositra	1 (14)	M	0	<i>Gm</i> / <i>At</i>
R7: D.I.A.N.A. (N.W.)	D14: Diego S.	8 (31)	M	0	<i>Gm</i>
	D15: Ambilobe	5 (10)	F	0	<i>Gm</i>
	D16: Nosy be	5 (7)	F	0	<i>Gm</i>
	D17: Ambanja	2 (8)	M	0	<i>Gm</i>
R8: S.A.V.A. (N.E.)	D18: Sambava	6 (68)	M	0	<i>Gm</i>
	D19: Antalaha	7 (18)	M	0	<i>Gm</i>
R9: Boeny (W)	D20: Majunga	2 (25)	M	0	<i>Gm</i>
	D21: Ambato B.	2 (15)	F	0	<i>Gm</i>
R10: Sofia (W.N.)	D22: Befandriana N.	6 (11)	M	0	<i>Gm</i>
R11: Analanjirofo (E)	D23: Soanierano I.	1 (19)	11M / 8F	0	<i>Gm</i>
	D24: Fenerive E.	3 (27)	M	100	<i>Gm</i> / <i>At</i>
R12: Antsinanana (E)	D25: Tamatave II	2 (4)	M	100*	<i>Gm</i>
	D26: Tamatave I	1 (4)	MT	0	<i>Gm</i>
R13: Anosy (S. E.)	D27: Taolagaro	10 (104)	M	0	<i>Gm</i>
R14: Androy (S. E.)	D28: Ambovombe A.	3 (16)	M	0	<i>Gm</i>
R15: Atsimo Andrefana (S.W.)	D29: Tuléar	14 (54)	M	0	<i>Gm</i>
R16: Menabe (S.W.)	D30: Morondava	1 (6)	M	0	<i>Gm</i>
Total		119 (695)			

*: district already infested in 2010 (DSV)

In both cases, PCR reactions products were electrophoresed on 2% agarose gels using molecular weight marker 1 kb to identify bands. Amplified fragments were sent to MacroGen© for sequencing. Sequences were assembled using MEGA package v4 (Kumar et al. 2008) and sequence alignments were performed using Clustal W v1.8 (Thompson et al. 1994). Phylogenetic reconstruction was based on the Neighbour-Joining methods as implemented in the MEGA package v4 (Kumar et al. 2008). Worldwide sequences of different mitochondrial haplotypes of *V. destructor* were inserted in the phylogeny from Genbank, with most of the sequences coming from Navajas et al. (2010).

Results

Varroa destructor spread in Madagascar

A total of 695 colonies located in 119 sites from 30 districts were inspected for the presence of mites (Fig 1, see details in Table S1). Most of the colonies (94.2%) were bred in hives of varying dimensions, with or without frames, traditional or using modern equipment (Fig 2). A total of 40 feral colonies were found all over Madagascar in natural emplacements (Table S1, Fig 2f). Although feral colonies were more difficult to examine, none of them seemed infested with mites. In four out of the 30 districts, beekeepers transported hives among their apiaries (Table S1). Mites infested three of these districts. In the other districts, swarms from the local environment were trapped and domesticated.

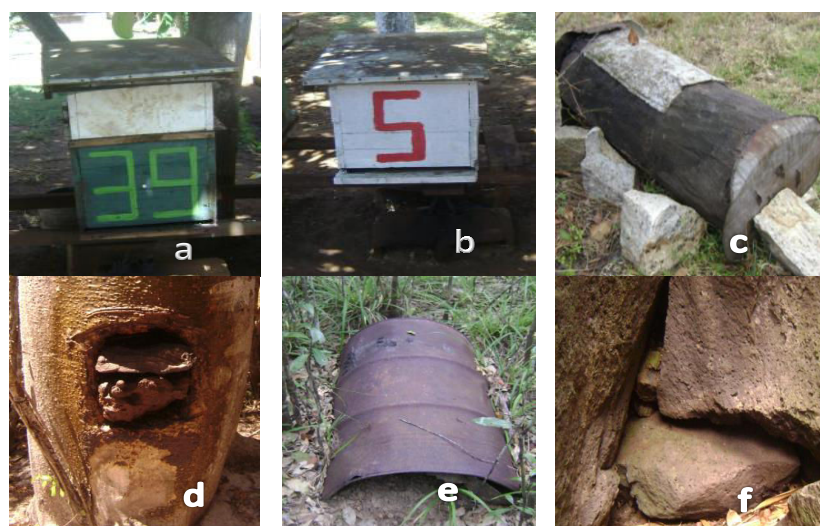


Figure 2: Diversity of hive types in Madagascar: Hives with frame, Langstroth (a) and Dadant (b); traditional hive patterns made of wood (c and d) and metal (e); wild colony in rock cavity (f).

In 2010, only four districts were infested (Fig 1) and in February 2012, a total of nine districts were infested. The five newly infested districts concentrated in the areas around the capital and on the eastern coast next to the first districts infested in 2010 (Fig 1). In these districts, all apiaries and colonies were contaminated by varroosis, except in one district (D8) where only two of the five apiaries monitored were infested. Abnormalities of honeybee morphology, such as deformed wings in adult workers, were only observed in four sites from three districts around the capital (D1, D2, D4, Table S1).

Prevalence of other parasites

Three other harmful arthropod species were observed in managed colonies: the greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), the small hive beetle *Aethina timida* (Coleoptera: Nitidulidae) and the death's-head hawkmoth *Acherontia* spp. (Lepidoptera: Sphingidae). Prevalence of these parasites greatly varied among districts (Table S1). *Galleria mellonella* was spread throughout Madagascar and observed in all apiaries, whereas *A. timida* was observed in all colonies of three districts, D1 and D2 from the 'Highlands' and D24 on the eastern coast (Table S1). Colonies from D1 and D2 were the only ones to be infested by *Acherontia* spp., these two districts were therefore infested by all parasites and disease recorded.

***Varroa destructor* strain(s)**

Results of haplotype analyses were evaluated on 13 mites collected from 13 colonies from eight sites of five infested districts. Sequences were registered in Genbank with accession numbers JX827474-86. All sequences were identical. This mtDNA fragment, corresponding to partial COI, was 100% similar to the previously published Korean haplotype (Genbank accession number AF106899; Fig 3).



Figure 3: Neighbour-joining phylogenetic tree showing relationship between referenced haplotypes of *Varroa destructor* from GenBank (with their accession numbers) and the 13 sequences obtained from mites sampled in 8 districts in Madagascar (V13A: JX827474, V10A: JX827475, V14A: JX827476, V15A: JX827477, V23A: JX827478, V22A: JX827479, V20A: JX827480, V19A: JX827481, V8A: JX827482, V6A: JX827483, V5A: JX827484, V24A: JX827485, V21A: JX827486). District of origin is indicated in parenthesis.

Local survey over one year: levels of infestation and colony survival

In 2011, four out of the five sites surveyed were infested with mites, and in infested sites all colonies (n=55) were contaminated. In 2012, only 20 of the 55 previously infested colonies remained alive. In site S4, colonies had totally collapsed. Site S3, free of mites in 2011, was infested in 2012, and only eight of the 18 surveyed colonies survived the infestation (Table 1).

Table 1: Mortality rate over one year in sites from 4 districts of the Analamanga Region

Districts (D)	Sites (S)	Number of surviving colonies in		Mortality rate over one year
		2011	2012	
D1: Manjakandriana	S1: Betoho	25	13	48 %
D1: Manjakandriana	S2: Amby	14	6	57 %
D2: Anjozorobe	S3: Masakalina	18	8	56 %
D3: Antananarivo A.	S4: Ambohimaza	5	0	100%
D6: Antananarivo R.	S5: Cité de prof	11	1	91%

Discussion

After 2 years of presence in Madagascar we estimated the rate of dispersal at about 40 km/year, and detected only one haplotype of *V. destructor* in all infected sites (namely the Korean type). Despite its low rate of dispersal compared to other studies, the local monitoring of infested colonies over one year showed a mortality rate of 60%.

Spread and strain of *Varroa destructor*

After *V. destructor*'s first finding in Madagascar in 2010, both on the east coast close to the main port of the island and in the area close to the airport, the mite had infested neighboring districts. A total of four administrative regions (R1 next to R2, and R11 next to R12) were infested in 2012. COI gene analysis exhibited that all mites were of the Korean haplotype. These two simultaneous mite outbreaks observed 400 km apart, could either result from two independent infestations of *V. destructor* on the island, or from one single event followed by honeybee colony exchanges between the east coast and the capital areas. The Korean haplotype was reported on all European honeybee races worldwide and also in pure African and Africanized honeybee races, and it is known to reproduce not only on *A. mellifera* races almost worldwide (Solignac et al. 2005), but also on other *Apis* species from Europe, Middle East, Asia, America and Africa (Anderson and Trueman 2000; Maggi et al. 2012). In early 2009, *V. destructor* was first recorded attacking African strains of *A. m. scutellata* from Kenya and Tanzania. Sampling for mite presence following line typage in 2009 demonstrated that *V. destructor* Korean haplotype had spread to three countries from East Africa. According to Frazier et al. (2010), Korean haplotype presence in Ghana confirmed that the mite had also spread to certain parts of West Africa.

Although 695 honeybee colonies were surveyed in 30 districts of Madagascar, mites were found in only 215 managed colonies from nine districts. So, two years after its first report, its range had increased 20-80 km. However, *V. destructor* spread in Madagascar is relatively slow compared to mite dispersal rates recorded in other African countries. In Kenya and Tanzania *V. destructor* was first reported in early 2009, from more than 18 locations 650 km apart (Frazier et al. 2010). A similar example was observed in South Africa, a bigger country than Madagascar, where *V. destructor* was first detected in 1997 and spread to both managed and feral honeybee population throughout the country in 5 years, with a total of around 83 areas infested in 2002 (Allsopp 2006).

Rapid spread of the mite may be facilitated by the passage of mites into feral colonies

(Allsopp 2006). In our sampling only few feral colonies were surveyed (5.8%), none of which were found infested. According to our results, several beekeepers transported colonies among districts or sites; such beekeeping practices might have enhanced infestations. Since mite spread followed railroad transport or road juncture between distant sites and districts, human-mediated dispersal of mites seems unambiguous.

Pathogens and morphological abnormalities associated with *Varroa destructor* presence

Honeybee mortality due to *V. destructor* is known to involve direct and indirect mechanisms. Direct effects are caused by varroa's feeding on the haemolymph of honeybees (Calderon et al. 2012), with an adult female mite reported to consume up to 0.67 μ l haemolymph in 24 h (Bowen Walker and Gunn 2001). These repeated feedings cause both weakening and size reduction in the honeybee; weight and flight activity of infested colonies decreased as ectoparasitic densities increased (Ellis and Delaplane 2009). Furthermore, all damage conducted rapid mortality of various honeybee stages (brood and adult) of both sexes (drone and worker) (Calderon et al. 2012).

Our pathogen survey showed that the greater wax moth, *G. mellonella*, is widespread in Madagascar and, as observed elsewhere, does not represent a serious threat for healthy colonies (Sanford 1987). Still, it could have a negative impact on mite-infested colonies because weakened colonies with combs that are not properly stored are easy targets for such predators (Sandford 1987). In our sampling, two other potentially harmful species (*A. tumida* and *Acherontia* spp.) were only found in co-infestation with *V. destructor*. Because mites could reduce the honeybee's innate immune system (Yang and Cox-Foster 2005), mite-infested colonies are more vulnerable and other pathogens might more effectively affect honeybees. Colony infection by those two other pathogens could have occurred due to increased vulnerability after mite attack, but it is also possible that the parasites facilitated *V. destructor* infestation. In sub-Saharan Africa, *A. tumida* only infests weakened colonies (Lundie 1940; El-Niweiri et al. 2008) and is considered a minor pest. As an aside, beekeeping practice in infested areas, involving colony transportation, might have put severe stress on honeybees, thus enhancing their vulnerability to these pathogens.

Morphological abnormalities have been detected in mite-infested districts only. Deformed wing virus (DWV) is highly suspected, because it causes the same wing deformity as observed. About 18 pathogens are known to affect honeybees (Genersch 2010) and *V. destructor* is considered to be a vector of various viral diseases, such as Kashmir bee virus (KBV), Sacbrood virus (SBV), Acute bee paralysis virus (ABPV), Israeli acute paralysis virus

(IAPV), and DWV (Boecking and Genersch 2008). It has been demonstrated that mites increased the prevalence of DWV viral species (Martin et al. 2012), other authors also found a significant correlation between the degree of wing deformity and mite density (Yang and Cox-Foster 2005). Numerous studies demonstrated that multiple factors interacting contribute to colony death (Le Conte et al. 2010). For example, Ryba et al. (2012) found the co-existence of six viruses transmitted by *V. destructor* (including DWV) with two types of nosemosis diseases and American foulbrood, resulting in colony death in the Czech Republic. Finally, *V. destructor* is considered one of the major factors for colony death in Europe and in North America (Charrière and Neumann 2010; Le Conte et al. 2010).

Mortality rates of infested colony

Colony mortality rates over one year were about 60%, which is below mortality rates recorded in Europe with up to 70% of colony collapsing at the infestation stage (Guzmán-Novoa et al. 2010). These results could be explained by several non-exclusive factors. First, the rapid use of traditional chemical (thyme-based) controls, applied by beekeepers in the five sites infested during our survey (these treatments are not officially recognized in Madagascar). In the short term, effective treatment can keep a colony alive and lead to high mite mortality of >70% in infested colonies (Lindberg et al. 2000). Second, it could be linked to the biology and behavior of *A. m. unicolor*. Low fertility of *V. destructor* in worker brood, and grooming and hygienic behavior of the honeybee are mechanisms of disease tolerance observed in other African honeybees (Calderon et al. 2010), without the need of treatment. The African subspecies *A. m. scutellata* and *A. m. capensis* seem to tolerate and coexist with the imported mite without dramatic effects, once the initial infestation stage is passed (Allsopp 2006; Frazier et al. 2010). Several studies on African races demonstrate that they develop faster than other European races and due to the very short post-capping stage in Africanized honeybee, it was impossible for nearly 60% of the mother mites tested to produce viable female offspring (Medina and Martin 1999). African honeybee colonies also showed higher frequencies (up to 50%) and higher levels of hygienic behavior (95%), with respect to Spivak criterion (Frazier et al. 2010). Artificial mite infestation of honeybee colonies with brood showed that Africanized honeybee workers removed the infested brood at about double the rate of the pure European workers (Vieira and Marchini 2009). Studying the life cycle and hygienic behavior of *A. m. unicolor* are of first interest to understand the dynamics of *V. destructor* and to evaluate the consequences on its spread.

Our survey indicated that *V. destructor* was not omnipresent in Madagascar. In order to

minimize *V. destructor* spread and to protect districts still free of mites, a management plan must be implemented to prevent the movement of mites via colony transportation or beekeeping material exchange among districts. Nevertheless, these plans require beekeepers outreach and the declaration of all areas infested to be obligate for corresponding control.

Acknowledgements

We thank Patrick Turpin for mapping sites with GIS and Christoph Simiand for technical help in the laboratory. We thank the following people for their help with data collection: Vincent Porphyre, Carlos Borsa, Valentina Mandirola, Niaina Andrianaivoariseta, Julien Cattel, Quentin Chesnais and ADEFA. We are grateful to the malagasy beekeepers who participated in the study. This work is part of the PhD of Henriette Rasolofoarivao recipient of a grant of CIRAD-AIRD-Sud. Field work had been partly funded by CIRAD, the Enlargement and sustainability of the Plant Protection Network (ePRPV) project supported by the European Union, the French government, and Réunion collectivities.

References

- Allsopp, M.H. (1997) The honeybee parasitic mite *Varroa jacobsoni*. South African Bee Journal 69, 73-82
- Allsopp, M.H. (2004) Cape honeybee (*Apis mellifera capensis* Eschscholtz) and varroa mite (*Varroa destructor* Anderson & Trueman) threats to honeybees and beekeeping in Africa. Int J Trop Insect Sci 24, 87-94
- Allsopp, M.H. (2006) Analysis of *Varroa destructor* infestation of southern African honeybee populations. Msc (Zoology), University of Pretoria
- Anderson, D.L., S. Fuchs (1998) Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*. Journal of Apicultural Research 37, 69-78
- Anderson, D.L., J.W.H. Trueman (2000) *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. Experimental and Applied Acarology 24, 165-189
- Boecking, O., E. Genersch (2008) Varroosis—the ongoing crisis in bee keeping. Zeitschrift für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 3, 221-228
- Bowen Walker, P.L., A. Gunn (2001) The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. Entomologia Experimentalis et Applicata 101, 207-217
- Calderon, R.A., S. Urena, J.W. van Veen (2012) Reproduction of *Varroa destructor* and offspring mortality in worker and drone brood cells of Africanized honey bees. Experimental and Applied Acarology 56, 297-307
- Calderon, R.A., J.W. van Veen, M.J. Sommeijer, L.A. Sanchez (2010) Reproductive biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*). Experimental and Applied Acarology 50, 281-297
- Charrière, J.D., P. Neumann (2010) Surveys to estimate winter losses in Switzerland. Journal of Apicultural Research 49, 132-133
- Delatte, H., M. Virgilio, C. Simiand, A.M. Risterucci, M. DeMeyer, S. Quilici (2010) Isolation and characterization of microsatellite markers from *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett). Molecular Ecology Resources 10, 576-579
- Dietemann, V., C.W.W. Pirk, R. Crewe (2009) Is there a need for conservation of honeybees in Africa? Apidologie 40, 285-295 doi:10.1051/apido/2009013
- El-Niweiri, M.A.A., M.S. El-Sarrag, P. Neumann (2008) Filling the sudan gap: The northernmost natural distribution limit of small hive beetles. Journal of Apiculture

- Ellis, A., K. Delaplane (2009) Individual forager profits in *Apis mellifera* unaffected by a range of colony *Varroa destructor* densities. *Insectes Sociaux* 56, 419-424
- Frazier, M., E. Muli, T. Conklin, D. Schmehl, B. Torto, J. Frazier, J. Tumlinson, J.D. Evans, S. Raina (2010) A scientific note on *Varroa destructor* found in East Africa; threat or opportunity? *Apidologie* 41, 463-465
- Franck, P., L. Garnery, A. Loiseau, B.P. Oldroyd, H.R. Hepburn, M. Solignac, J.M. Cornuet (2001) Genetic diversity of the honeybee in africa: Microsatellite and mitochondrial data. *Heredity* 86, 420-430
- Ganzhorn, J.U., P.P. Lowry II, G.E. Schatz, S. Sommer (2001) The biodiversity of Madagascar: One of the world's hottest hotspots on its way out. *Oryx* 35, 346-348
- Genersch, E. (2010) Honey bee pathology: Current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87, 87-97
- Guzmán-Novoa, E., L. Eccles, Y. Calvete, J. McGowan, P.G. Kelly, A. Correa-Benítez (2010) *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie* 41, 443-450
- Kumar, S., M. Nei, J. Dudley, K. Tamura (2008) Mega: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9, 299-306
- Latreille, P.A. (1804) Notice des espèces d'abeilles vivant en grande société, ou d'abeilles proprement dites, et description d'espèces nouvelles. *Ann Mus Natl Hist Nat* 5, 161-178
- Le Conte, Y., M. Ellis, W. Ritter (2010) *Varroa* mites and honey bee health: Can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie* 41, 353-363
- Lindberg, C.M., A.P. Melathopoulos, M.L. Winston (2000) Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite. *Journal of Economic Entomology* 93, 189-198
- Lundie, A.E. (1940) The small hive beetle, *Aethina tumida*. *Science Bulletin Department of Agriculture and Forestry, Union of South Africa*
- Maggi, M., S. Medici, S. Quintana, S. Ruffinengo, J. Marcangeli, P.G. Martinez, S. Fuselli, M. Eguaras (2012) Genetic structure of *Varroa destructor* populations infesting *Apis mellifera* colonies in Argentina. *Experimental and Applied Acarology* 56, 309-318
- Martin, S.J., A.C. Highfield, L. Brettell, E.M. Villalobos, G.E. Budge, M. Powell, S. Nikaido, D.C. Schroeder (2012) Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite.

- Medina, L.M., S.J. Martin (1999) A comparative study of *Varroa jacobsoni* reproduction in worker cells of honey bees (*Apis mellifera*) in England and africanized bees in Yucatan, Mexico. *Experimental and Applied Acarology* 23, 659-667
- Navajas, M., D.L. Anderson, L.I. de Guzman, Z.Y. Huang, J. Clement, T. Zhou, Y. Le Conte (2010) New Asian types of *Varroa destructor*: A potential new threat for world apiculture. *Apidologie* 41, 181-193 doi:10.1051/apido/2009068
- Ralalaharisoa-Ramamonjisoa, Z., H. Ralimananaï, D. Lobreau-Callen (1996) Comportement de butinage d'*Apis mellifera* var *unicolor* (Hymenoptera, Apidae) dans divers biotopes. *Biogéographie de Madagascar*, 517-522
- Ryba, S., D. Titera, I. Schodlbauerova-Traxmandlova, P. Kindlmann (2012) Prevalence of honeybee viruses in the Czech Republic and coinfections with other honeybee disease. *Biologia* 67, 590-595
- Sanford, M.T. (1987) Diseases and pests of the honey bee. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 1-12
- Solignac, M., J.M. Cornuet, D. Vautrin, Y. Le Conte, D. Anderson, J. Evans, S. Cros-Arteil, M. Navajas (2005) The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272, 411
- Stern, R.A., S. Gazit (1996) Lychee pollination by the honeybee. *J Am Soc Hort* 120, 152-157
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, T.J. Gibson (1994) Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680
- Vieira, G.H.D., L.C. Marchini (2009) Diversity of bees (Hymenoptera: Apoidea) in a cerrado area in the city of Cassilandia, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Sociobiology* 53, 597-607
- Whitfield, C.W., S.K. Behura, S.H. Berlocher, A.G. Clark, J.S. Johnston, W.S. Sheppard, D.R. Smith, A.V. Suarez, D. Weaver, N.D. Tsutsui (2006) Thrice out of Africa: Ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* 314, 642-645
- Yang, X., D.L. Cox-Foster (2005) Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 7470

CHAPITRE III

Diversité génétique de *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidea), une espèce invasive décrite sur l'abeille *Apis mellifera unicolor* (Hymenoptera: Apoidea)

Henriette Rasolofoarivao, Johanna Clémencet, Adrien Speck, Lala Harivelo Raveloson Ravaomanarivo, Bernard Reynaud, Hélène Delatte

Résumé

Varroa destructor est une espèce exotique envahissante et a été reportée parasitant *Apis mellifera unicolor*, abeille endémique de Madagascar depuis 2010. L'étude de sa diversité et de sa structuration génétique nucléaire était notre objectif principal. En utilisant 11 loci microsatellites et 344 acariens issus de 12 ruchers, une faible diversité génétique a été observée, avec seulement 8 Génotypes Multi-Locus (MLG) identifiés. Les populations de *V. destructor* forment un seul groupe, la richesse clonale varie de 0,02 à 0,14, et le nombre de MLGs entre les ruchers varie entre 1 à 6. Environ 70% des acariens analysés sont de même génotypes (100%, homozygote), et 20% ont un génotype ne différant que par une seule mutation. L'abondance élevée de MLG dans les ruchers des Hauts Plateaux (8 MLGs) par rapport à la côte Est (2 MLGs) et la présence des MLGs particuliers dans les ruchers de la capitale conforte l'hypothèse que *V. destructor* a été d'abord introduit dans des ruchers proches de l'aéroport international, puis s'est dispersé dans d'autres régions grâce aux échanges commerciaux via la capitale. Cette étude génétique constitue une étape importante pour suivre l'adaptation de *V. destructor* au sein des différentes populations d'*A. m. unicolor*.

Mots clés : espèce clonale, Génotypes Multi- Locus, *V. destructor*

Nuclear genetic diversity of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidea), invasive species reported in honey bee *Apis mellifera unicolor* (Hymenoptera: Apoidea)

Henriette Rasolofoarivao^{*,†}, Johanna Clémencet[°], Adrien Speck^{*}, Lala Harivelo Raveloson Ravaomanarivo[†], Bernard Reynaud^{*}, Hélène Delatte^{*}

^{*}CIRAD, UMR PVBMT, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

[†]Département d'Entomologie, Faculté de Sciences, Université d'Antananarivo, B.P. 906, Antananarivo (101), Madagascar

[°]Université de La Réunion, UMR PVBMT, 97715 Saint Denis cedex 9, La Réunion, France

Corresponding author: Hélène Delatte, CIRAD UMR PVBMT, 7, chemin de l'IRAT, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

Running title: Genetic diversity of *Varroa destructor* from Madagascar

Abstract

Varroa destructor is an invasive alien species that has been reported parasitizing *A. m. unicolor* the endemic honey bee of Madagascar since 2010. Comprehensive knowledge about its nuclear genetic diversity and structuration was our main goal. Using 11 microsatellite loci and 344 mites spread from 12 apiaries, we observed a low genetic diversity, with only 8 Multi-Locus Genotypes (MLG) identified. *Varroa destructor* populations form a single cluster, clonal richness ranged from 0.02 to 0.14, and number of MLG within apiaries varied between 1 to 6 MLGs. About 69.5% of the mites analyzed harbored the same genotype (100%, homozygous), and 23.3% had a genotype differing by a single allele. The abundance of MLGs in the High Lands apiaries (8 MLGs) than on the East coast (2 MLGs) and the presence of particular MLGs in High Lands apiaries favors the hypothesis that *V. destructor* have been first introduced closed to the international airport, and then spread to others regions by commercial exchanges. These genetic studies are an important component to monitor *V. destructor* adaptation to *A. m. unicolor* subspecies.

Key words: clonal species, multi-locus genotypes, *V. destructor*

Introduction

Varroa destructor is an invasive alien species (Handley et al., 2011; Barlow and Goldson, 2002). Like other invasive invertebrates species, *V. destructor* could successfully establish in new environmental conditions, even from a very limited number of specimens (Dlugosch and Parker, 2008; Handley et al., 2011). By exchange of live honey bees, *V. destructor* shifted from its original host *Apis cerana* and invaded the subspecies *Apis mellifera* (Denmark et al., 1991; Frazier et al., 2010; 1986). In *Apis mellifera* colonies, this ectoparasite damages both adults and brood by sucking haemolymph (Rosenkranz et al., 2010) and by transmitting viral diseases (Boecking and Genersch, 2008; 2010).

Studies on invasive populations of *V. destructor* have shown that genetic diversity may change after introduction (Navajas et al., 2010); it is widely expected to observe a decrease in genetic diversity in the invaded zone compared to the population of the native area (Solignac et al., 2003). At the founding stage, the number of individuals introduced is usually small and contains only a low portion of the "genetic pool" presents in the area of origin (Navajas et al., 2010). Furthermore, level of genetic diversity in the invaded zone depends on the number of introductions (single or repeated introductions in time) and the contribution of individuals from different populations of the native area. Indeed, when the introduced individuals originated from genetically heterogeneous populations, gene flow in the new environment colonized may allow genetic mixing that generates a higher allelic diversity (Dlugosch and Parker, 2008).

A successful invasion of an alien species is related to the high phenotypic plasticity and its mode of reproduction. With clonal reproduction (Solignac et al., 2005; Solignac et al., 2003), *V. destructor* can generate five to six generations per year, which help it to adapt quickly to a new host. This parasite reproduces by brother-sister mating (adelphogamy), a system which largely favors the fixation of new mutations (Cornuet et al., 2006).

Isolated environments, such as islands, are fragile and more susceptible to invasions of alien species (Molles, 2006, 2005). *Varroa destructor* of Korean type (K1-1) was introduced to Madagascar in 2010 (OIE- Feb-2010; Rasolofoarivao et al., 2013) and has been reported parasitizing *A. m. unicolor* (Latreille, 1804) the endemic honey bee of Madagascar (Ruttner, 1988). The impact of the parasite on *A. m. unicolor* was severe; with about 60% of colony losses in a year reported in 2012 (Rasolofoarivao et al., 2013). However, the spread of the mite was relatively slow and its presence was confined to the High Land and the East coast (Rasolofoarivao et al., 2013). Here we investigated the genetic diversity of *V. destructor* by genotyping mites from all the infested apiaries.

Materials and methods

Varroa destructor sampling

Sampling of phoretic *V. destructor* was carried out from January 2011 to January 2012 in 69 managed colonies from 12 infested apiaries (Fig. 1, Table 1). Two apiaries were located on the East coast and 10 in the High Lands region. Worker honey bees were randomly sampled inside the hive and preserved in 96 % ethanol. Number of workers per apiary varied between 2 to 315. In the laboratory, tubes were vigorously shaken to dislodge *V. destructor* from the bodies of the worker, and each worker was visually inspected to remove any mites on the bee's surfaces. Samples were stored separately in a new tube with 96 % ethanol and frozen at -20°C until they were processed.

Table 1. Apiary information, for each sampled apiary is given: number of colonies and mites collected (number in parenthesis refers to individuals that have not been used for molecular analysis), sampling years and the Multi- locus genotypes (MLG). Load of mite on adult honey bee worker was evaluated in 3 apiaries in asterisk (Table 2).

Apiaries codes	Apiaries location	Number of colonies	Number of mites	Sampling year	MLG detected
S01	Rantolava	1	1	2012	8
S02	Mahambo	2	5	2012	3, 8
S03	Masakalina	4	7	2012	3, 7, 8
S04	Ambohitrolomahitsy	6	15	2012	3, 7, 8
S05	Amby*	(3) 11	(103) 136	2011	1, 2, 3, 6, 7, 8
S06	Ambotseheny	6	8	2012	3, 8
S07	Anjepy	7	13	2012	3, 8
S08	Betoho*	(4) 11	(110) 231	2011	3, 4, 5, 7, 8
S09	Mandraka	1	20	2012	2, 3, 7, 8
S10	Ankatso*	(9) 2	(12) 9	2011	3, 8
S11	Andramasina	1	6	2012	3
S12	Ambatolampy	1	29	2012	3, 8

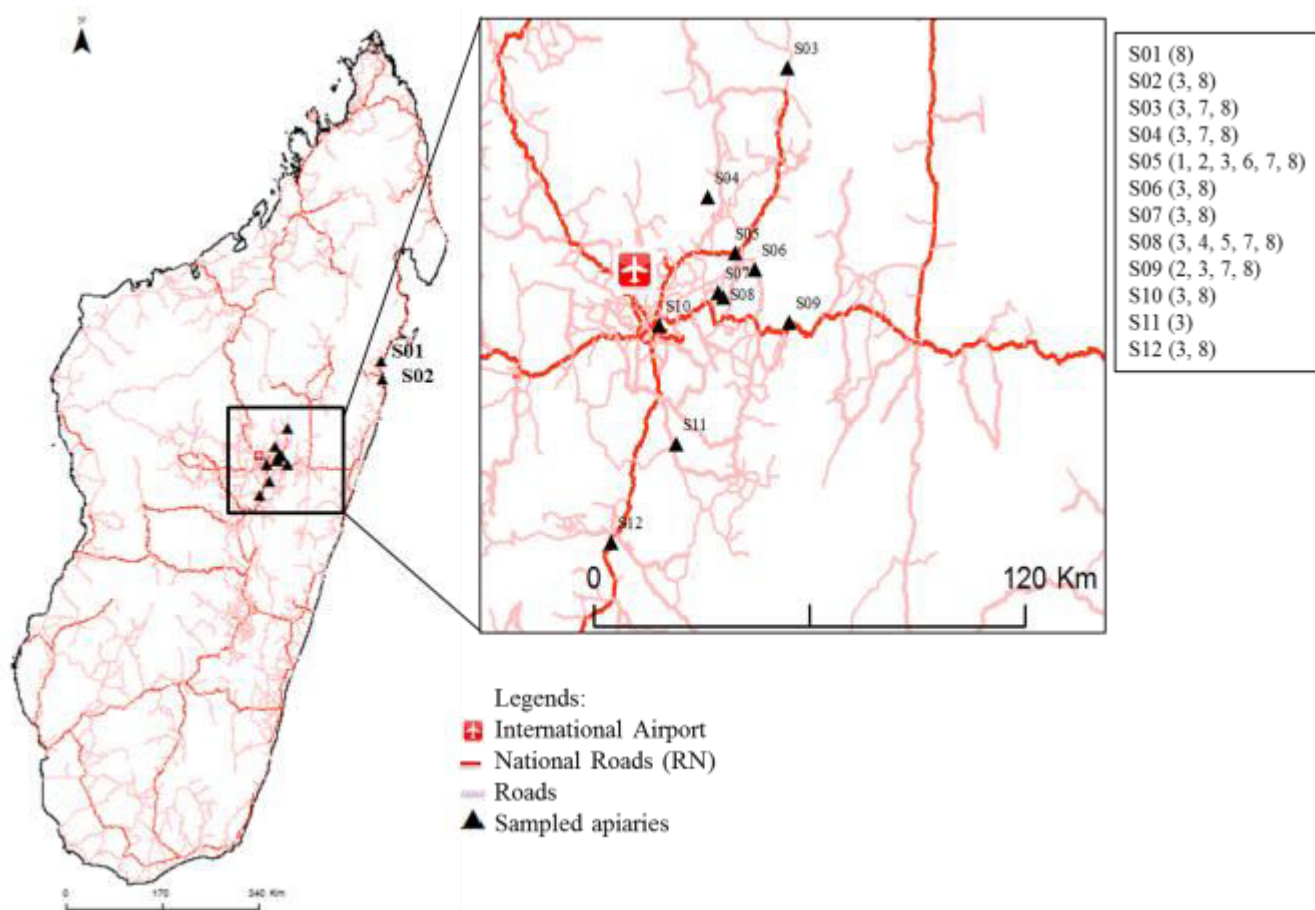


Figure 1: Location of the 12 apiaries sampled to study genetic diversity and structure of *V. destructor*. For each apiary (names indicated in Table 1), the different Multi-locus genotypes (MLGs) observed are given (at right).

Level of infestation on adult honey bee

Infestation levels were estimated for 40 of the 69 sampled colonies. All investigated colonies were sampled in 2011, from 3 apiaries of the High Lands region. Mite load was counted from sampled honey bees and colony infestation level was estimated as the number of mites per worker (34 to 46 workers / colony, SD. Table 1). Apiaries were distant from 15 km (S05/S08), 20 km (S08/S10) to 30 km (S05/S10). Analysis of variance (ANOVA) was used to test variability of infestation level among colonies and apiaries, then, difference between each pair of apiaries was compared using the Tukey HSD (Honestly Significant Difference) test. All statistic tests were implemented in R package V.3. 0.1 (Development Core Team, 2013).

Supplementary Data Table 1. For each of the colonies studied to estimate *V. destructor* levels of infestation in 2011, numbers of workers and mites collected are detailed.

Apiary	Colony	Number	Number
code	Number	of workers	of mites
S05	A01	35	21
	A02	35	32
	A03	36	12
	A04	35	30
	A05	34	16
	A06	36	4
	A07	35	7
	A08	34	21
	A09	36	23
	A10	35	8
	A11	37	9
	A12	35	29
	A13	36	9
	A14	36	18
Ncol=14		Nw=495	Nm=239
S08	B01	35	14
	B02	46	37
	B03	34	15
	B04	38	38
	B05	39	37
	B06	35	5
	B07	40	22
	B08	40	48
	B09	39	10
	B10	36	21
	B11	35	17
	B12	35	3
	B13	35	21
	B14	36	22
	B15	37	31
Ncol=15		Nw=560	Nm=341

	C01	36	5
	C02	35	6
	C03	35	1
	C04	35	6
	C05	34	0
S10	C06	35	3
	C07	39	0
	C08	38	0
	C09	36	0
	C10	36	0
	C11	38	0
	Ncol=11	Nw=397	Nm=21

DNA extraction and genotyping of *V. destructor*

Total DNA of 480 *V. destructor* was isolated using the protocol of extraction as previously described (Delatte et al., 2010), it consists in extracting DNA from whole mite by crushing them individually in a SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)/ Proteinase K buffer and precipitating DNA in ethanol.

DNA of each sample was amplified at 12 microsatellite loci (SD. Table 2): two (vj292, vj295) among those published by (Evans, 2000) and 10 (VD001, VD016, VD112, VD114, VD119, VD126, VD146, VD152, VD154, VD163) by Solignac et al. (2003). PCR reactions were performed in a 10 µl final reaction volume using two primer mix and Type-it Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN) kits. PCR program was run with an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles at 95°C for 30 sec, annealing for 1 min at 55°C, and then elongation at 72°C for 1 min. A final extension step was done at 72°C for 10 min. PCR products were then prepared for capillary electrophoresis by adding 1 µl of the final PCR product to 11.7 µl of formamide and 0.3 µl of LIZ500 DNA ladder as an internal standard. The mixture was then denatured for 5 min at 95°C and placed on ice for at least 5 min. Twelve µl of mixture were genotyped using an automated DNA sequencer Applied Biosystems (AB). Electrophoresis profiles were obtained by AB 3130XL data collection. Allele identification at each locus was performed by comparison with the size standard using Genemapper V. 4.0 software (AB).

Supplementary Data Table 2. List of 12 microsatellite loci (Solignac and al., 2003; Evans, 2000): sequence, repeat motif and size of each fluorescent primer, Genbank Accession number. Annealing temperature was fixed 55 °C in each PCR conditions of two mixes, nb represents the number of allele per locus.

Loci	Primer sequences (5'-3')	Motif	Fluo. dyes	Accession number	nb
VD001	CCCGCGAACGAAATAAATAGAG AGCCACCTACGGTGCTCG	(GA) ₁₀ - (GA) ₆ (GA) ₅	NED	AJ558164	3
VD016	TCATGCACTACGACGAAGGC ACGTTTATGCATGCACAAATACG	(TC) ₇ GC(TC) ₅	PET	AJ558166	1
VD114	GCAGATTAGGAAGAATAAGCCG CTCATACGACACTTGCCATAGG	(CT) ₈	PET	AJ558169	1
VD126	ACCGGAAGCCGCCTAATC TTTATGACTATCTAAACGTGTATTGGG	(AG) ₁₃	FAM	AJ558173	-
VD146	TGGCTCATGCATTATCGTTG AGCGTTTGGAGAGTGAGAAATAC	(AC) ₁₀	FAM	AJ558176	1
VD152	GAAGGCGACATTAACGTCGG GTTGCGTTTCCCATATCG	(CA) ₁₀ - (CA) ₄	VIC	AJ558175	1
vj292	TGAAAGCTGGTGTGAGTTACG GCCCCTGACAACATGAACTT	(CT) ₁₈ CC(CT) ₅	NED	AF229982	1
vj295	TCCACCAGATACAGTGAAAT CGGACCTTTCTTCCCATACA	(TC) ₁₇	VIC	AF229984	4
VD112	TAACATATGGCTAGCGACGG CGTCGCTCATTATGGAACG	(TC) ₇ GC(TC) ₅	FAM	AJ558168	2
VD119	CACTGTTACGTTACAATTAAGCACG TCTTGATCCCAAATGTAATTAGAGG	(AT) ₆ - (TG) ₉	PET	AJ558171	1
VD154	ACTCTGCCCCGTAATTGGCA CATTTCAGCATCGACCATATTGTC	(CA) ₁₁	NED	AJ558178	1
VD163	CAAGAGTCGGATTGGCGC ATAGTATGCTTCTATATATCTCTGAGTTTTAT	(CA) ₁₀	VIC	AJ558179	1

Population genetic analysis

Individuals with missing genotype data were excluded from analysis. Only apiaries with at least 10 samples were considered for the population genetics analysis. Samples differing by one or two alleles were regenotype to exclude scoring errors. All pairs of loci were tested for linkage disequilibrium using the probability test in Genepop V. 4.2 (Rousset, 2008). Gene diversity within populations was estimated using observed (H_O) and expected (H_E)

heterozygosity implemented in Genepop V.4.2 (Rousset, 2008). Single and multilocus F_{IS} were estimated through the fixation index of (Weir and Cockerham, 1984). Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were tested using a two-tailed Fisher's exact test based on Markov-chain randomization (1000 dememorizations with 100 batches and 1000 iterations per batch (Rousset, 2008). As number of alleles observed within a given population could be positively affected by the sample size (Leberg, 2002), allelic richness, adjusted by the lowest sample size (Leberg, 2002) were calculated using Fstat V. 2.9 (Goudet, 2001). Weir's pairwise F_{ST} (Weir and Cockerham, 1984) were calculated across all population pairs in order to assess genetic differentiation between apiaries.

Levels of population ($N=344$) admixture were quantified through a number of Bayesian clustering procedures implemented in Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Structure calculates clustering patterns solely based on MLG (Falush et al., 2007). The number of clusters was inferred according to (Evanno et al., 2005) and the ad hoc statistic was calculated for K ranging from 1 to 10. Structure was run for 1 million generations (burn-in = 10 000 generations) with 10 iterations for each value of K . Had hoc statistic was processed through the Structure harvester website (<http://taylor0.ucla.edu/structureHarvester/>).

Clonality estimation

Multilocus genotypes (MLGs) were assigned using the GenClone V. 2.0 software (Arnaud-Haond and Belkhir, 2007). Level of clonality was estimated using genotypic richness (R) (Dorken and Eckert, 2001), with $R = 0$ when population consists in a single clone, and 1 when each individual possesses a unique MLG. Simpson index (D , also known as Nei's genetic diversity), value corrected for finite sample sizes, was also calculated (D ranging from zero to one, with higher values corresponding to greater genotypic diversity), Evenness (E) is the measure of how MLG are distributed and their abundance among sample (E ranging from 0 to 1, with 1 indicating that all MLGs have equal abundance). All clonality indices were calculated per apiary using the GenClone V. 2.0 software (Arnaud-Haond and Belkhir, 2007). Matrix of pairwise distances between distinct MLG was used to construct a minimum spanning network using the NETWORK 4.6.1.2 software (Polzin and Daneshmand, 2003).

Results

Adult honey bee infestation

A total of 1452 honey bees from 40 colonies were examined to estimate *V. destructor* infestation, with a minimum of 36 workers inspected per colony (SD. Table 1). Within each apiary, rate of *V. destructor* on adult honey bee was not significantly different among colonies (Kruskal-Wallis, $df = 36$, $P = 0.37$) and ranged from 0 to 1.2 mites per worker (SD. Table 1), while, there was a significant apiary effect (Kruskal-Wallis, $df = 2$, $P = 2.55E-05$), average infestation rate of mites (mean \pm SD) varied from 0.05 ± 0.07 (S10), 0.48 ± 0.25 (S05) to 0.61 ± 0.30 (S08) (Fig. 2) overall, 0.41 ± 0.33 . Colonies from S10 had significant lower mite infestation levels than the 2 others apiaries (Tukey's test, $P < 0.05$) while no significant difference was found between S05 and S08 (Tukey's test, $P = 0.47$).

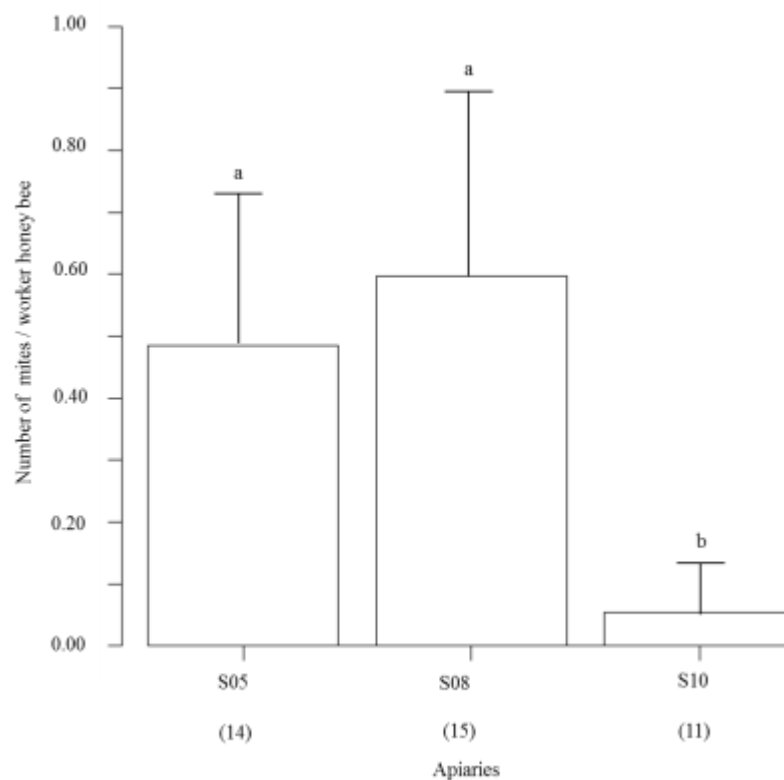


Figure 2. Levels of *V. destructor* infestation within 3 apiaries (S05, S08, S10), standardized as the number of mites per worker honey bee, values between parenthesis represent the number of colonies examined in each apiary. Means (\pm SD) with the same letter are not significantly different (Tukey, $P > 0.05$).

Genetic diversity

Of the 480 mites analysed, 344 were successfully genotyped at all the microsatellite loci. Of the 12 sampled apiaries, only six had more than 10 mites genotyped at 100% of their loci (Table 3). Among the set of 11 primers considered, only 3 were polymorphic (VD001, VD112, vj295). Number of alleles at the 3 polymorphic loci was 2 alleles for VD112, 3 for VD001 and 4 for vj295 (SD Table 2). A total of 11 alleles across the 11 loci were congruent with previously observed by Solignac et al. (2003) and Evans (2000) in *V. destructor* worldwide population (Table 2). New alleles such as 125 and 127 were found in locus VD001, allele 110 in VD112, and allele 140, 143 in vj295. There is not linkage disequilibrium between locus pair (Fisher's exact test, $P > 0.05$).

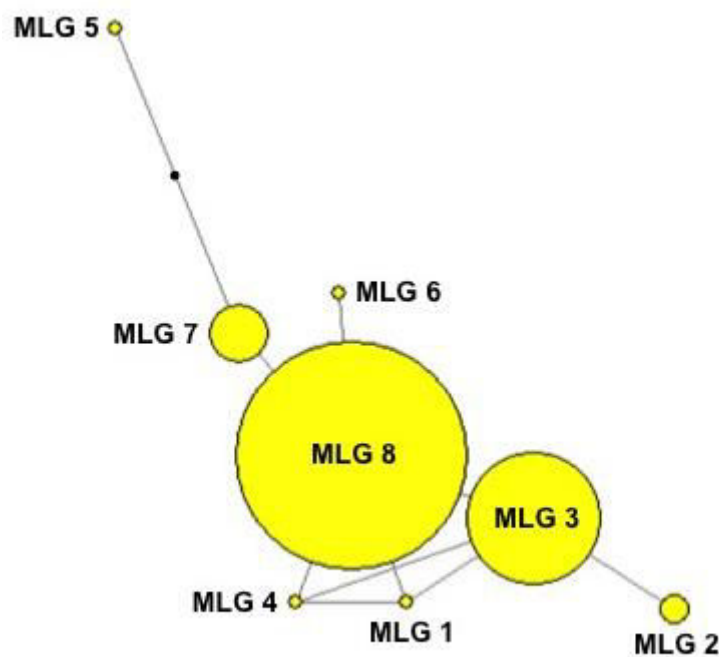


Figure 3. Minimum spanning network of *V. destructor* genetic distances computed as number of allele differences between MLGs (11 microsatellite loci). Each circle represents a different MLG, circle size is proportional to sample size, and line between the circles indicates a difference of one allele.

Clonal diversity

A total of 8 MLGs were found and arbitrarily coded from 1 to 8 (Table 2). MLGs are not equally represented (Fig. 3). MLGs 3 and 8, accounting for 92.8% of the data set, 23.3 and 69.5% respectively (Fig. 4). The most frequent MLG (8) is homozygous at all loci.

Table 2. Observed microsatellite Multi - Locus Genotypes (MLG), allele size (pb) at each locus. Bold font indicates MLG allelic variations. Nb represents the number of samples per MLG.

MLG	VD001	VD016	VD114	VD146	VD152	vj292	vj295	VD112	VD119	VD154	VD163
1	155/155	270/270	221/221	174/174	224/224	233/233	140/155	140/140	120/120	127/127	112/112
2	155/155	270/270	221/221	174/174	224/224	233/233	143/143	140/140	120/120	127/127	112/112
3	155/155	270/270	221/221	174/174	224/224	233/233	143/155	140/140	120/120	127/127	112/112
4	155/155	270/270	221/221	174/174	224/224	233/233	147/155	140/140	120/120	127/127	112/112
5	125/125	270/270	221/221	174/174	224/224	233/233	155/155	110/140	120/120	127/127	112/112
6	127/155	270/270	221/221	174/174	224/224	233/233	155/155	140/140	120/120	127/127	112/112
7	155/155	270/270	221/221	174/174	224/224	233/233	155/155	110/140	120/120	127/127	112/112
8	155/155	270/270	221/221	174/174	224/224	233/233	155/155	140/140	120/120	127/127	112/112

Six MLGs (1, 3, 4, 6, 5, and 7) are heterozygous at one locus only, deriving from one mutation event from the dominant one (except MLG 5, with 3 alleles distinct from MLG 8, Fig. 3). MLG 2 is also homozygous at all loci, showing 2 allele differences with MLG 8 (Fig. 3). Distribution of the pairwise number of allele differences between MLGs in the whole dataset appeared uni-modal with 1 to 5 alleles of difference between MLGs (Fig.4).

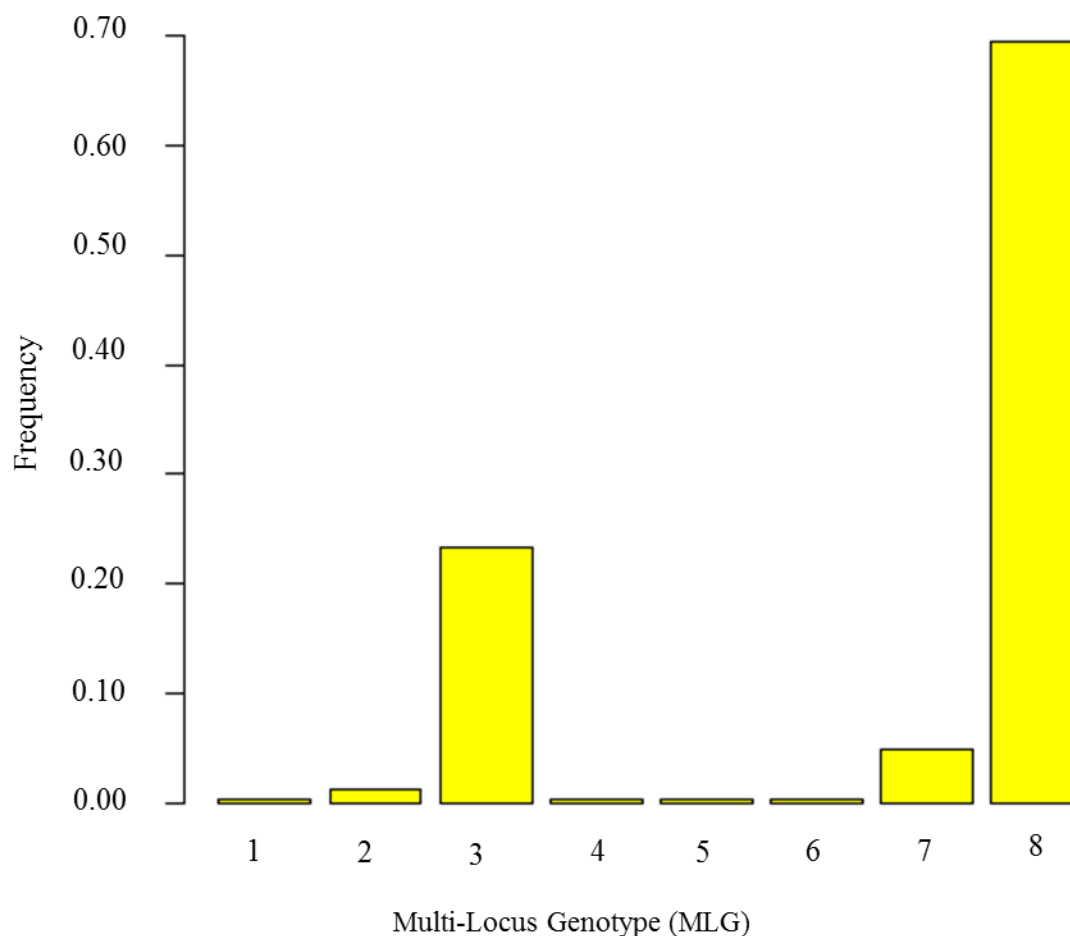


Figure 4. Frequency of each Multi- Locus Genotype (8 MLGs) detected in the whole dataset (344 samples).

The number of MLGs per apiaries ranged from 1 (S01) to 6 (S05). The two most frequent MLGs (3 and 8) were found in all apiaries (expected in S01 for MLG 3 and S11 for MLG 8). Consistent with the MLGs network, MLG 5 and MLG 2 were present in the same apiary than their genetically closest MLG, respectively MLG7 in S08 and MLG 3 in S05 and S09. All MLGs were identified in the High Lands region. In contrast, on the East coast, with only 6 mites analysed, only two MLGs were detected (MLG 3 and MLG 8). Two particular MLGs were detected in the population from 2 apiaries next the international airport, S08 and S05, these two apiaries have 5 and 6 MLGs, respectively.

Structuration of the genetic diversity within and among apiaries

Mean allelic richness within apiaries was very low and close to 1 (1.09 -1.18, see Table 3). Levels of expected heterozygosity were close to zero, ranging from 0.01 to 0.05 (Table 3). Observed heterozygosity levels were not significantly different, F_{is} ranged from -0.47 to 0.42, significant deficit or excess of heterozygotes was not detected at any population ($P \geq 0.05$).

The genetic differentiation among apiaries, estimated as F_{ST} , ranged from -0.03 to 0.29, with pairwise F_{ST} estimates being significant for 4 pairs of populations (S07 with S04 and S05 with S07, S08, S09 $P < 0.05$; Table 4).

Table 3. Descriptive statistics of genetic and clonal diversity across all loci (11 microsatellite loci) for 6 of the 12 populations (i.e. apiaries with more than 10 individuals successfully genotyped).

Apiary	N	G	R	D	E	Ar	H _E	H _O	F _{IS}
S04	15	3	0.14	0.53	0.60	1.18	0.03	0.03	-0.06
S05	64	6	0.08	0.26	0.16	1.13	0.01	0.01	0.18
S07	12	2	0.09	0.48	0.84	1.09	0.04	0.06	-0.47
S08	183	5	0.02	0.43	0.51	1.14	0.02	0.02	-0.07
S09	16	4	0.20	0.71	0.80	1.18	0.05	0.03	0.42
S12	22	2	0.05	0.41	0.75	1.09	0.02	0.02	-0.13
	312	8							
Overall	344	8	0.02	0.46	0.50	1.16	0.03	0.03	-0.02

N: Number of samples

G: Number of MLGs detected

R: Clonal richness index as $R = (G-1)/(N-1)$ (Dorken and Eckert, 2001)

D: Simpson's index (Arnaud-Haond et al., 2007)

E: Evenness (Arnaud-Haond et al., 2007)

Ar: Allele richness adjusted for sample size

H_E: Unbiased expected heterozygosity (Nei, 1987)

H_O: Observed heterozygosity

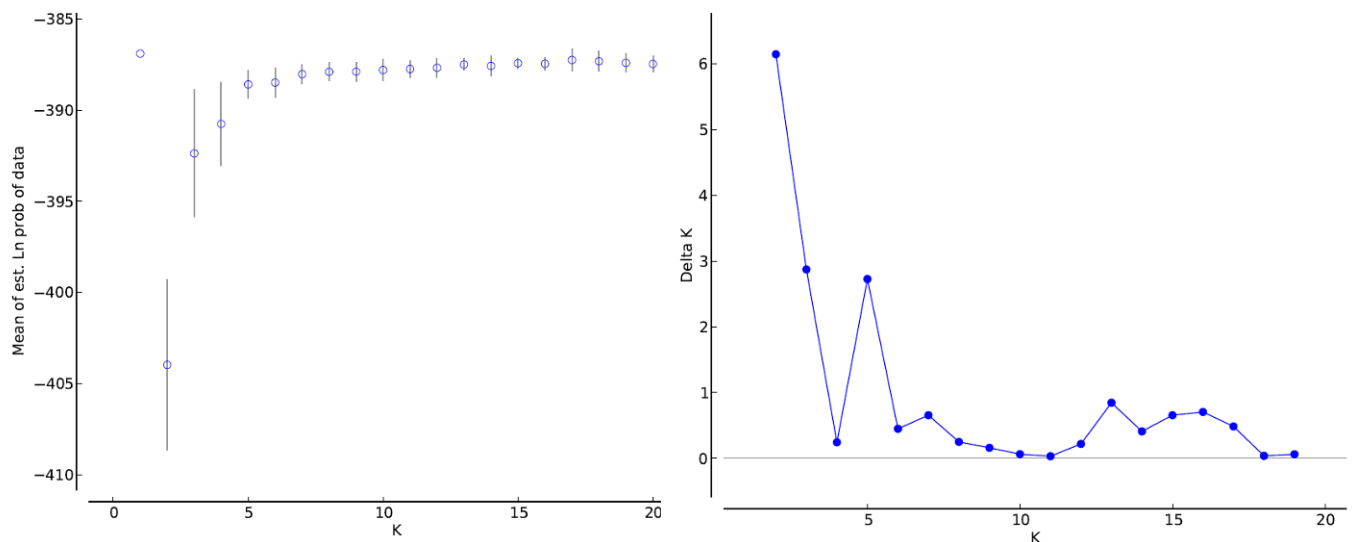
F_{IS}: Inbreeding coefficient, all F_{IS} are not significant departures from HWE ($P \geq 0.05$)

Table 4. Genetic differentiation (F_{ST}) between each pair of populations estimated across all loci, (i. e. apiaries with more than 10 individuals successfully genotyped). Significant pairwise F_{ST} comparisons at the $P < 0.05$ level are indicated with asterisk.

Apiary	S04	S05	S07	S08	S09
S05	0.01				
S07	0.16*	0.29*			
S08	0.02	0.02*	0.13		
S09	0.06	0.19*	-0.03	0.07	
S12	0.03	0.04	0.09	-0.01	0.03

Overall clonal richness was of 0.02 and ranged from 0.02 to 0.14 within apiaries. Overall Simpson's index was 0.46. The lowest Simpson's index was found in S05 ($D = 0.26$) and the highest in S09 ($D = 0.71$). Overall Evenness index was of 0.50 and ranged from 0.16 to 0.84 within populations, i.e., MLGs were unequally distributed (Fig. 1, Fig. 3). MLGs richness within apiaries (Table 3) was not consistently correlated with sample size (N), for instance, apiary S09 ($N = 16$) had 4 distinct MLGs and consequently the highest clonal richness ($R = 0.20$) and allelic richness ($Ar = 1.18$).

Based in individual Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE software (SD Fig. 1, SD Fig. 2), no further recognizable population groups were observed, all the samples both from High Land and East Cost were considered as a single genetic cluster.



Supplementary figure 1. A. Absolute values of the likelihood distribution (Mean \pm SD). **B.** Delta K calculated as $(\Delta k) = m|L''(K)|/s[L(K)]$ according to Evanno et al. (2005).

Discussion

Introduction of *V. destructor* in the island

After *V. destructor*'s first description in Madagascar in 2010, both on the East coast close to the main port of the island (East) and in the area close to the airport (High lands), the mite had infested neighbouring districts. These two simultaneous mite outbreaks observed 400 km apart, could either result from two independent infestations of *V. destructor* on the island, or from one single event followed by honeybee colony exchanges between the east coast and the capital areas (Rasolofoarivao et al., 2013). COI (Cytochrome Oxidase I) gene analysis showed that all mites were of the Korean strain (K1-1) (Rasolofoarivao et al., 2013). Our nuclear genetic results suggest a single introduction event for several reasons: first, the same homozygous genotype was overrepresented (almost 70%), the second most common one (MLG-3), differed by 1 mutation only, both were widespread in all apiaries and at the center of the MLG network, second we found no evidence of admixture from multiple founding populations in the Bayesian cluster analysis, lastly, low gene diversity ($H_E = 0.03$) was found within populations.

The greater abundance of MLGs in the High Lands (8 MLGs) than on the East coast (only 2 MLGs) and the presence of particular MLGs in capital apiaries, favor the hypothesis that *V. destructor* have been first introduced closed to the international airport, and then spread to other regions by commercial exchanges, as most of the goods transit in the capital.

As suggested by Solignac (2003), reduced genetic diversity detected in *V. destructor* species may result from a severe bottleneck, which probably occurred at the time of parasite transfer from *A. cerana* to *A. mellifera* (Solignac et al., 2005; Solignac et al., 2003). Moreover, the reduced nuclear genetic diversity of *V. destructor* in newly invaded populations of *A. mellifera* could be explained by a second strong founder effect (Tsutsui et al., 2000).

Not surprisingly, in *A. m. unicolor* populations, 69.5% of the mites analyzed harbored the same genotype (100%, homozygous, MLG 8), and 23.3% had a genotype differing by a single mutation only (allele 143 instead of 155, locus Vj295, MLG 3) from the dominant one. Rare genotypes were detected, indicating that punctual changes (eg: in loci VD001, VD112, vj295, SD. Table 2) had occurred since the introduction. Such punctual changes (mutations) at other non-neutral locus may favor local adaptations of mite populations to different climatic conditions and allow rapid adaptation of the strain to honey bee populations. The observed MLG diversity, even weak and highly skewed, could help to follow the future invasion process in Madagascar honey bee populations.

Infestation level on adult honey bee

The level of infestation estimated in 2011 on 3 apiaries ranged from 0.05, 0.48 to 0.61 *V. destructor* per adult honey bee. In temperate climate, it has been reported that the parasite could be more virulent (Fries et al., 1991a; Fries et al., 1991b; Ritter and De Jong, 1984) than in tropical environments. Infestation rates in European honey bee can reach 0.47 mites/worker (n=92 colonies) (Fries et al., 2006) while infestation rates in Africanized honey bee (n= 4 colonies) ranged from 0.03 to 0.11 mites/worker in tropical and humid mesothermic region, respectively (Moretto et al., 1991). Rates were reported as subspecies specific, but authors specify that it is difficult to separate the effects of subspecies and climate (Moretto et al., 1991). *Apis mellifera unicolor* is among the tropical honey bees of African A lineage, infestation level in 2011, one year after mite occurrence in *A. m. unicolor* honey bees was found to be high, causing apparent high level of colony losses (Rasolofoarivao et al., 2013). Similar cases were found in Africanised and African honey bees, high infestation values were detected at the beginning of the *V. destructor* arrival only (Allsopp, 2007). Lower levels of mite were recorded after one year in Africanized honey bee, within 3 to 5 years in *A. m. capensis* and 6 to 7 years in *A. m. scutellata* (Allsopp, 2007), on average below 0.05 mites per worker in untreated colonies were observed.

Infestation levels of our colonies were found to be different from one apiary to another, ranging from low (0.05) to high (0.60) mites per worker. Such variation among apiaries could be explained by non-exclusive factors. Treatment methods used by the beekeepers could differ and not be fully adequate to reduced mite infestation. Several mechanisms, such as a decreased mite fertility, greater efficiency of hygienic or grooming behaviors of honeybees (Spivak and Reuter, 2001; Villa, 2006), are heritable traits and could reduce the *V. destructor* reproduction success and decrease the number of migrating phoretic mites that infest workers. Low infestation in some honey bee populations could have evolved relatively fast by natural selection of one or several of this heritable traits. Factors such as longer brood rearing periods, large amounts of drone brood, honey bee population and honey storage in mite-infested colonies can also influence the mite population level (Murilhas, 2002).

Interestingly, only 2 MLGs have been detected in the population with the lowest infestation rate, against 5 and 6 MLGs detected in the two other apiaries, S08 and S05 respectively. This could be interpreted either as genetic diversity arising from high mites fertility and numerous

reproductive event, or increased genetic diversity of the mite population as a factor facilitating infestation of the honeybee colonies.

Clonal structure of *V. destructor* populations in *A. m. unicolor* within and between apiaries was confirmed, that suggests a single place of introduction of *V. destructor* strain (K1-1) on the island. *Varroa destructor* populations in *A. m. unicolor* had a reduced genetic diversity (in term number of allele/ locus) than European and African mite populations (Solignac et al., 2003; Evans, 2000) from which they can derive, nevertheless, punctual changes (mutations) in genotype may be linked by rapid adaptation of this introduced species on honey bee.

Acknowledgments

We would thank Niaina Andrianaivoariseta and Dimby Razafindrazaka for their help with data collection. We are grateful to the Malagasy beekeepers who participated in the study. This work is part of the PhD of Henriette Rasolofoarivao recipient of a grant of CIRAD-AIRD-Sud. Field work had been partly funded by CIRAD, the Enlargement and sustainability of the Plant Protection Network (ePRPV) project supported by the European Union, the French government, and Réunion collectivities.

References

- Allsopp, M.H. (2007) Analysis of *Varroa destructor* infestation of southern African honey bee populations (Thesis)
- Arnaud- Haond, S., K. Belkhir (2007) Genclone: A computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Molecular Ecology Notes* 7, 15-17
- Boecking, O., E. Genersch (2008) Varroosis-the ongoing crisis in bee keeping. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 3, 221-228
- Barlow, N.D., S. Goldson (2002) Alien invertebrates in new zealand. *Biological Invasions* CRC, Boca Raton, 195-216
- Cornuet, J., M. Beaumont, A. Estoup, M. Solignac (2006) Inference on microsatellite mutation processes in the invasive mite, *Varroa destructor*, using reversible jump markov chain monte carlo. *Theoretical Population Biology* 69, 129-144
- de Miranda, J.R., G. Cordoni, G. Budge (2010) The acute bee paralysis virus-kashmir bee virus-israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S30-S47
- Delatte, H., M. Virgilio, C. Simiand, A. Risterucci, M. De Meyer, S. Quilici (2010) Isolation and characterization of microsatellite markers from *Bactrocera cucurbitae* (coquillett). *Molecular Ecology Resource* 10, 576-579
- Denmark, H.A., H.L. Cromroy, L. Cutts (1991) Varroa mite, *Varroa jacobsoni* oudemans: (Acari: Varroidae), Fla. Department Agric. & Consumer Serv., Division of Plant Industry
- Dlugosch, K., I. Parker (2008) Founding events in species invasions: Genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* 17, 431-449
- Dorken, M.E., C.G. Eckert (2001) severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Journal of Ecology* 89, 339-350
- Evanno, G., S. Regnaut, J. Goudet (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611-2620
- Evans, J.D. (2000) Microsatellite loci in the honey bee parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Molecular Ecology* 9, 1436-1438
- Falush, D., M. Stephens, J.K. Pritchard (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7, 574-578
- Fazier, M., E. Muli, T. Conklin, D. Schmehl, B. Torto, J. Frazier, J. Tumlinson, J.D. Evans, S. Raina (2010) A scientific note on *Varroa destructor* found in east Africa; threat or opportunity? *Apidologie* 41, 463-465

- Fries, I., A. Aarhus, H. Hansen, S. Korpela (1991a) Comparison of diagnostic methods for detection of low infestation levels of *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Experimental & Applied Acarology* 10, 279-287
- Fries, I., A. Aarhus, H. Hansen, S. Korpela (1991b) Development of early infestations by the mite *Varroa jacobsoni* in honeybee (*Apis mellifera*) colonies in cold climates. *Experimental & Applied Acarology* 11, 205-214
- Fries, I., A. Imdorf, P. Rosenkranz (2006) Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a nordic climate. *Apidologie* 37, 564-570
- Goudet, J. (2001) Fstat, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9. 3).
- Handley, L.-J.L., A. Estoup, D. Evans, C. Thomas, E. Lombaert, B. Facon, A. Aebi, H. Roy (2011) Ecological genetics of invasive alien species. *BioControl* 56, 409-428
- Latreille, P. (1804) Notice des espèces d'abeilles vivant en grande société, ou abeilles proprement dites et description d'espèces nouvelles. *Ann Mus Natl Hist Nat* 5, 161 à 178
- Leberg, P. (2002) Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology* 11, 2445-2449
- Mikawa, F. A study on the extermination of *Varroa jacobsoni*. In: *Proceedings of the XXXth International Congress of Apiculture* (1986), 1986. p 178-179
- Molles, M.C. (2006) *Ecology: Concepts and Applications*. Ecología: Conceptos y aplicaciones, Madrid: McGraw-Hill Interamericana
- Moretto, G., L. Gonçalves, D. De Jong, M. Bichuette (1991) The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* and infestations in Brazil. *Apidologie* 22, 197-203
- Murilhas, A.M. (2002) *Varroa destructor* infestation impact on *Apis mellifera carnica* capped worker brood production, bee population and honey storage in a mediterranean climate. *Apidologie* 33, 271-282
- Navajas, M., D.L. Anderson, L.I. de Guzman, Z.Y. Huang, J. Clement, T. Zhou, Y. Le Conte (2010) New Asian types of *Varroa destructor*: A potential new threat for world apiculture. *Apidologie* 41, 181-193
- Polzin, T., S.V. Daneshmand (2003) On steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters* 31, 12-20
- Pritchard, J.K., M. Stephens, P. Donnelly (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959
- Rasolofoarivao, H., J. Clémencet, L.H.R. Ravaomanarivo, D. Razafindrazaka, B. Reynaud, H. Delatte (2013) Spread and strain determination of *Varroa destructor* (acari: Varroidae) in

- Madagascar since its first report in 2010. *Experimental and Applied Acarology* 60, 521-530
- Ritter, W., D. De Jong (1984) Reproduction of *Varroa jacobsoni* oud. in Europe, the Middle East and tropical South America. *Z Ang Entomol* 98, 55-57
- Rosenkranz, P., P. Aumeier, B. Ziegelmann (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, S96-S119
- Rousset, F. (2008) Genepop' 007: A complete re-implementation of the Genepop software for windows and linux. *Molecular Ecology Resources* 8, 103-106
- Ruttner, F. (1988) Biogeography and taxonomy of honey bees, Springer-Verlag
- Solignac, M., J.M. Cornuet, D. Vautrin, Y. Le Conte, D. Anderson, J. Evans, S. Cros-Arteil, M. Navajas (2005) The invasive korea and japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272, 411-419
- Solignac, M., D. Vautrin, A. Pizzo, M. Navajas, Y. Le Conte, J.M. Cornuet (2003) Characterization of microsatellite markers for the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives. *Molecular Ecology Notes* 3, 556-559
- Spivak, M., G.S. Reuter (2001) *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. *Journal of Economic Entomology* 94, 326-331
- Tsutsui, N.D., A.V. Suarez, D.A. Holway, T.J. Case (2000) Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 5948-5953
- Villa, J.D. (2006) Autogrooming and bee age influence migration of tracheal mites to Russian and susceptible worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research and Bee World* 45, 28
- Weir, B.S., C.C. Cockerham (1984) Estimating f-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 1358-1370

CHAPITRE IV

Etude du comportement hygiénique d'*Apis mellifera unicolor* (Hymenoptera: Apidae), l'abeille endémique de Madagascar

Rasolofoarivao H, Delatte H, Raveloson Ravaomanarivo LH, Reynaud B and Clémencet J

Ce chapitre a été accepté dans le journal Genetics and Molecular Research sous réserve de correction.

Résumé

Le comportement hygiénique est un des mécanismes naturels de défenses de l'abeille contre les maladies du couvain et l'invasion des colonies par le parasite *Varroa destructor*. L'objectif de cette étude était de mesurer la capacité de détection et de nettoyage des couvains morts sur 403 colonies d'*Apis mellifera unicolor* issues de 3 régions géographiques, infestées ou indemnes de *V. destructor* à Madagascar. La méthode de perforation des couvains à l'aide d'une aiguille a été utilisée pour évaluer le comportement hygiénique des abeilles. Les réponses des abeilles par nettoyage des couvains morts ont été mesurées à partir de 3h 30 jusqu'à 7 h après la perforation des cellules. Les colonies détectent rapidement les cellules perforées, ainsi, durant les quatre premières heures, elles ont pu détecter au moins 50% des cellules perforées avec des couvains morts. Six heures après perforation des cellules, les colonies suivies (N=91) ont montré des pourcentages de cellules désoperculées variant de 0 à 100% et entre 0% à 82% de cellules totalement nettoyées (désoperculées et vidées de leur couvain). Aussi, en se basant sur la variabilité du taux de cellules nettoyées à 6 h, 3 groupes peuvent être avancés (faiblement, moyennement et fortement nettoyeuses). De par les résultats obtenus, la présence de colonies hautement hygiéniques par rapport à d'autres peu actives est évidente et offre une opportunité pour l'élaboration de futurs programmes de sélection se basant sur le comportement hygiénique de la colonie d'abeille.

Mots clés : comportement hygiénique, test à l'aiguille, *Apis mellifera unicolor*, *Varroa destructor*

Assessing hygienic behavior of *Apis mellifera unicolor* (Hymenoptera: Apidae), the endemic honey bee from Madagascar

Rasolofoarivao H^{1,2,3}, Delatte H², Raveloson Ravaomanarivo LH¹, Reynaud B² and Clémencet J³

¹ Département d'Entomologie, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, B.P. 906, Antananarivo (101), Madagascar

² UMR PVBMT, CIRAD, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

³ UMR PVBMT, Université de La Réunion, 97715 Saint Denis cedex 9, La Réunion, France

Abbreviated title: Hygienic behavior of *Apis mellifera unicolor*

Abstract

Hygienic behavior is one of the natural mechanisms of honey bee tolerance toward brood diseases and *Varroa destructor* parasitic mite. Our objective was to measure hygienic behavior of *Apis mellifera unicolor* colonies (N = 403) from 3 geographic regions (one infested and 2 free of *V. destructor*) in Madagascar. The pin-killing method was used for the evaluation of the HB, responses were measured 3 h 30 to 7 h after perforation. Colonies were very effective in detecting perforated cells. In the first 4 hours, colonies had, on average, detected at least 50% of the pin-killed brood. Six hours after cells perforation, tested colonies (N = 91) showed a wide range of uncapped (0 to 100%) and cleaned cells (0 to 82%) percentage. Global distribution of cleaned cells rate at 6 h was multimodal and hygienic responses could be split in 3 classes. Colonies from the 3 regions showed a significant difference in HB response. Three hypotheses (geographic, genetic traits, *V. destructor* presence) are further discussed to explain variability of HB responses among regions. Levels of HB efficiency of *A. m. unicolor* colonies are among the greatest levels reported from *A. mellifera* subspecies. Presence of highly hygienic colonies is a great opportunity for future breeding program to select for HB.

Key words: Hygienic behavior; Pin-test; *Apis mellifera unicolor*; *Varroa destructor*

Introduction

Apis mellifera unicolor, the endemic honey bee of Madagascar (Latreille, 1804) has a major role in both the agro and natural ecosystems. Indeed, in this Hotspot of biodiversity (Mittermeier et al., 2011), it contributes to the pollination of the endemic phanerogam plants, among which 80% are endemic (Ganzhorn et al., 2001).

Varroa destructor, a serious pest of honey bee (*Apis mellifera*) has been reported for the first time on the island in 2010 (OIE notification, 11 Feb- 2010) and was found in 4 administrative regions in 2012 (Rasolofoarivao et al., 2013). Dramatic managed colony losses have been recorded in infested areas (Rasolofoarivao et al., 2013), however, feral honey bee losses are still unknown. To limit the spread of this ectoparasite, exchange of colonies between districts has been strictly forbidden since 2010. The destruction of the parasitized colonies and hives was even recommended in infested apiaries. Despite these governmental measures, *V. destructor* has continued to spread in other areas (Rasolofoarivao, pers. com.). On their side, beekeepers started to use other technics to control *V. destructor*, such as removing male brood cells, or using chemical products (Amitraz, Apivar, thyme essentials oils; pers. obs. 2011; breeding ministry, 2012). But the use of chemicals has limits, residues can remain in the honey and can have negative effects on honey bee health (Johnson et al., 2010), moreover, *V. destructor* strain(s) could develop a resistance to acaricide (Lodesani et al., 2009). Furthermore, the use of traditional hives (with non-removable frames) limits further control, and chemical products are expensive for small scale beekeepers, so that, a long-term measure will be needed to protect beekeeping.

Hygienic behavior (HB) is a natural behavioral defense mechanism against attack by *V. destructor* (Spivak, 1996). Basically, HB of a worker is defined as the ability to detect, uncapped cells with dead or infected brood and remove it from the nest (Rothenbuhler, 1964). Highly hygienic colonies are more sensitive to odor of dead brood (Masterman et al., 2001) and remove it in a shorter time than others (Gramacho, 1999; Palacio et al., 2005). In infested colonies, the removal of damaged brood inside the sealed cell interrupts *V. destructor* immature growth, leads to a prolonged female phoretic phase and decreases the number of offspring per mother mite (Fries et al., 1994), and has therefore a major influence on the population dynamics of *V. destructor*.

Hygienic behavior in the honey bee is highly variable among and within populations and subspecies (Spivak and Gilliam, 1998, Athreya and Reddy 2013). The high tolerance to *V. destructor* of its natural host *A. cerana* (Boecking and Spivak, 1999) and of the Africanized honey bee (Guerra Jr et al., 2000), could in part due to greater HB efficiency (but see Aumeier et al., 2000).

Since HB has a genetic basis (Rothenbuhler, 1964) and is a heritable trait (Boecking and Spivak, 1999) much attention has been directed at breeding *V. destructor*-tolerant honey bee lines. The proportion of highly hygienic colonies has been increased through artificial selection in commercial European or American honey bee populations (Spivak and Gilliam, 1998; Palacio et al., 2000; Gregorc and Lokar, 2011).

The endemic honey bee subspecies from Madagascar, *A. m. unicolor* has never been studied for HB, so, our objects were i) to indirectly measure the potential tolerance of *A. m. unicolor* to *V. destructor* by HB tests, ii) to compare variability of HB response of colonies from different regions, iii) to classify colonies in different hygienic classes for future potential selection program.

Material and methods

Experimental site

Hygienic tests were conducted in 3 geographic regions, one on the west coast (R1: Morondava), and two located on the High Lands (R2: Ambositra and R3: Antananarivo) (Figure 1). Assays were performed during November 2012, from March to May 2013 and from June to August 2013 in R3, R2 and R1 respectively. Colonies from R3 were all infested by *V. destructor* while colonies from R1 and R2 were free of the mite. Colonies tested in R3 (N = 28) belonged to a unique beekeeper, while 197 and 178 colonies, each belonging to 10 beekeepers were tested in R1 and R2 respectively. All hives were Dadant or Langstroth model and contained 9 to 24 frames. Tests were performed on colonies containing at least four full frames of brood at all stages.

Biological materials

We investigated mitochondrial and nuclear genetic diversity and structure of 129 colonies tested for HB (30 colonies from R1, 76 from R2 and 23 from R3). tRNA-leu- COII mitochondrial region (Garnery et al., 1992) was used for mitochondrial analysis. mtDNA profiles were examined by DraI restriction fragment length polymorphism for all the 129 colonies, tRNA-leu- COII mtDNA amplified fragments (N = 10) were then sequenced for control as described in Rasolofoarivao et al. (submitted). Nuclear diversity was estimated (one

individual per colony) using 17 microsatellite loci (Solignac et al., 2003). DNA extractions and PCR amplifications were conducted as described in Rasolofoarivao et al. (submitted).

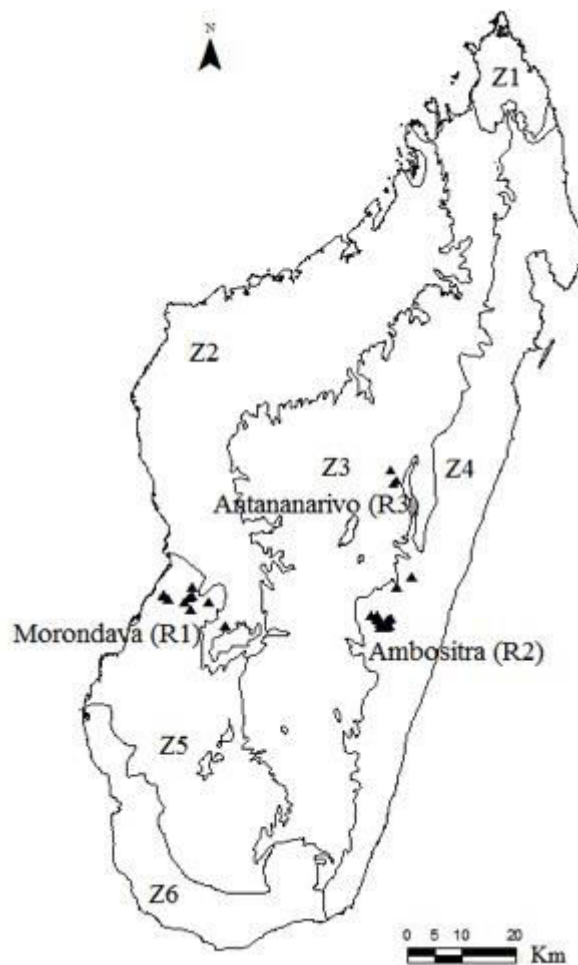


Figure 1. Distribution of the apiaries (black triangles) from 3 regions (R1, R2, and R3) used for pin killing tests. Six ecological zonations (Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, and Z6) of Madagascar are presented in the map. (Map source: Atlas de Madagascar, (2010)). Z1: North: dry deciduous forest, hard tropical climate; Z2: West: dry deciduous forest, hot tropical climate during hard season; Z3: Center: high land, sub humid forest, altitude tropical climate; Z4: East: wetter area of island, lowland forest, sub equatorial climate; Z5: South west: succulent woodlands, hard tropical climate; Z6: South: half desert, spiny thickets, hard tropical climate.

Genetic differentiation among regions was quantified by calculating pairwise F_{ST} values (Weir and Cockerham, 1984) implemented in Genetix 4.05 (Belkhir et al., 1996). A multivariate analysis, i.e Principal Components Analysis (PCA) (Jombart, 2008), was used to describe the genetic structure between individuals of the 3 regions (ade4 package implemented in R software version 3.01, Development Core Team 2013).

Choice of brood killing method

As some colonies were free of *V. destructor*, we artificially killed the brood to measure HB response as an indication of the willingness of the colony to remove mite infested brood (Boecking and Spivak, 1999; Palacio et al., 2000). The pin-killing brood method has been chosen instead of the freeze-killed method, because it is easier to use in the field, less

expensive to implement, less time and labor consuming. Indeed, tendency of honey bees to remove perforated brood is faster (Panasiuk et al., 2008) because workers can more easily recognize dead brood due to volatile compounds of haemolymph (Gramacho et al., 1999). As the method is easy to handle and cheap, Malagasy beekeepers could practice it by their own.

Killing brood and hygienic categories

HB was estimated on the basis of the pin-killing brood method. Two comb square sections, each containing 25 capped brood cells, i.e., 50 cells per colony, were chosen for perforation. Insect pin number 2 was used and inserted in the middle of each cell. Pin was pushed in body of the brood until it reached the base of the cell. Tested frame was quickly turned back in the hive after a first photograph (T_0). Hygienic success rate of the colonies was checked 3 h 30 min to 7 h after the pin-killing of the brood, a second photograph (T_x) had allowed us to count the number of (un) capped and (un) cleaned cells. In R3, the same colonies ($N = 28$) were photographed twice, 4 h and 6 h after perforation. To cover a larger time scale and avoid any potential effect of derangement, colonies from R1 and R2 were checked only once. Each colony was randomly affected to one of the 8 time intervals classes defined. Number of colonies tested per time class (30 min) varied between to 8 to 49.

Perforated cells were classified into 4 different categories (I, A, B, C): intact cells (I), partially uncapped cells (A), fully uncapped cells with brood still remaining (B), cleaned cells, i.e. fully uncapped and brood removed (C).

Statistical analysis

Three stages of response were considered. Detected cells ($A+B+C$), uncapped cells ($B+C$) and cleaned cells (C) percentages were calculated and examined at different times after pin-killing brood. Data analysis was performed using R version 3.01 (Development Core Team 2013). Residuals distribution of the data was visually checked for normality. A Generalized Linear Model (GLM) approach was used to test whether there were any significant relationship between time and percentage of each cleaning stage after perforation and in each region. Distribution of the cleaned cells rate measured 6 h after perforation, was examined considering the whole data set ($N = 91$) and for each region separately (36 colonies from R1, 27 from R2 and 28 from R3). Rebmix package (Nagode and Fajdiga, 2011) was applied to estimate the distribution mode (uni- vs multimodal) of the global cleaned cells rate. Fischer test was used to test for significant differences in the distribution of cleaned cells rates between each pairwise region.

Results

Genetic results

We confirmed that all tested colonies belonged to *A. m. unicolor* subspecies. A single African haplotype (A_1) previously published (Franck et al., 2001) was retrieved. DNA sequences ($N = 10$) were all the same, and identical to A_1 -Mad1 (Accession number KF976992), the one published by Rasolofoarivao et al. (submitted). F_{ST} values were 0.01 (R2/R3), 0.05 (R1/R2), and 0.11 (R1/R3), P-values being highly significant for each region pairs across all loci. PCA presented in figure 2 illustrates the nuclear genetic diversity between pre-defined colonies from the 3 regions.

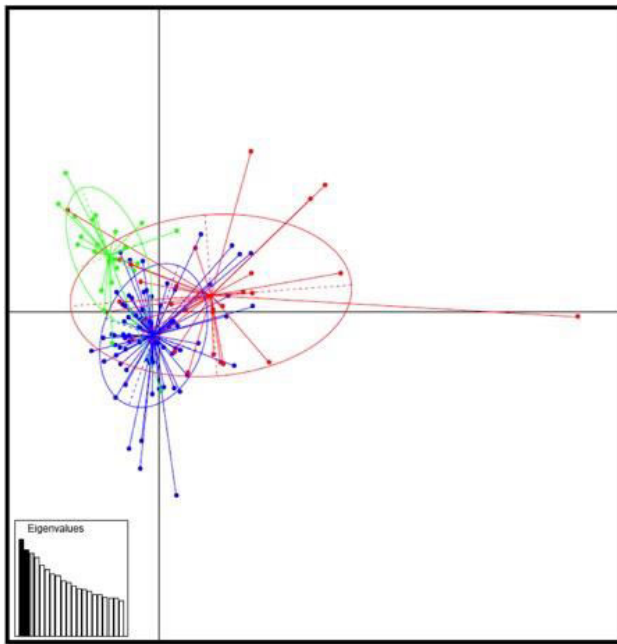


Figure 2. Principal Components Analysis (PCA, Jombart et al. 2008) performed on a data set of 129 individuals (30 colonies from R1, 76 from R2 and 23 from R3) genotyped at 17 microsatellite loci. Individuals are represented by dots; colors reflect geographical areas of samples (red: R1, blue: R2, and green: R3). 66.7 % inertia ellipses are drawn for each region. The bar graph insert displays the variance explained by the two discriminant eigenvalues used for plotting.

Hygienic behavior

A total of 403 colonies from 3 regions were tested for HB. Variability in hygienic responses was found between colonies tested at different time intervals for each hygienic stage and each region (GLM, all $P < 0.05$) (Figure 3). In the first 4 hours, colonies had, on average, detected at least 50% of the perforated cells (Figure 3). In R3, the average percentage of detected cells reached more than 80% after 4 h, with two colonies detecting 100% of the perforated cells. Four hours after perforation, all the colonies had already some fully uncapped cells. Nine of the tested colonies had uncapped 100% of the perforated cells within 6 h. None of the tested colonies in this study had cleaned 100% of the cells within the 7 h of the experiment. In the same time interval, at 6 h, colonies displayed a wide range of detected cells (32 to 100%), of uncapped cells (0 to 100%) and of cleaned cells percentage (0 to 82%) (Table 1, Figure 4).

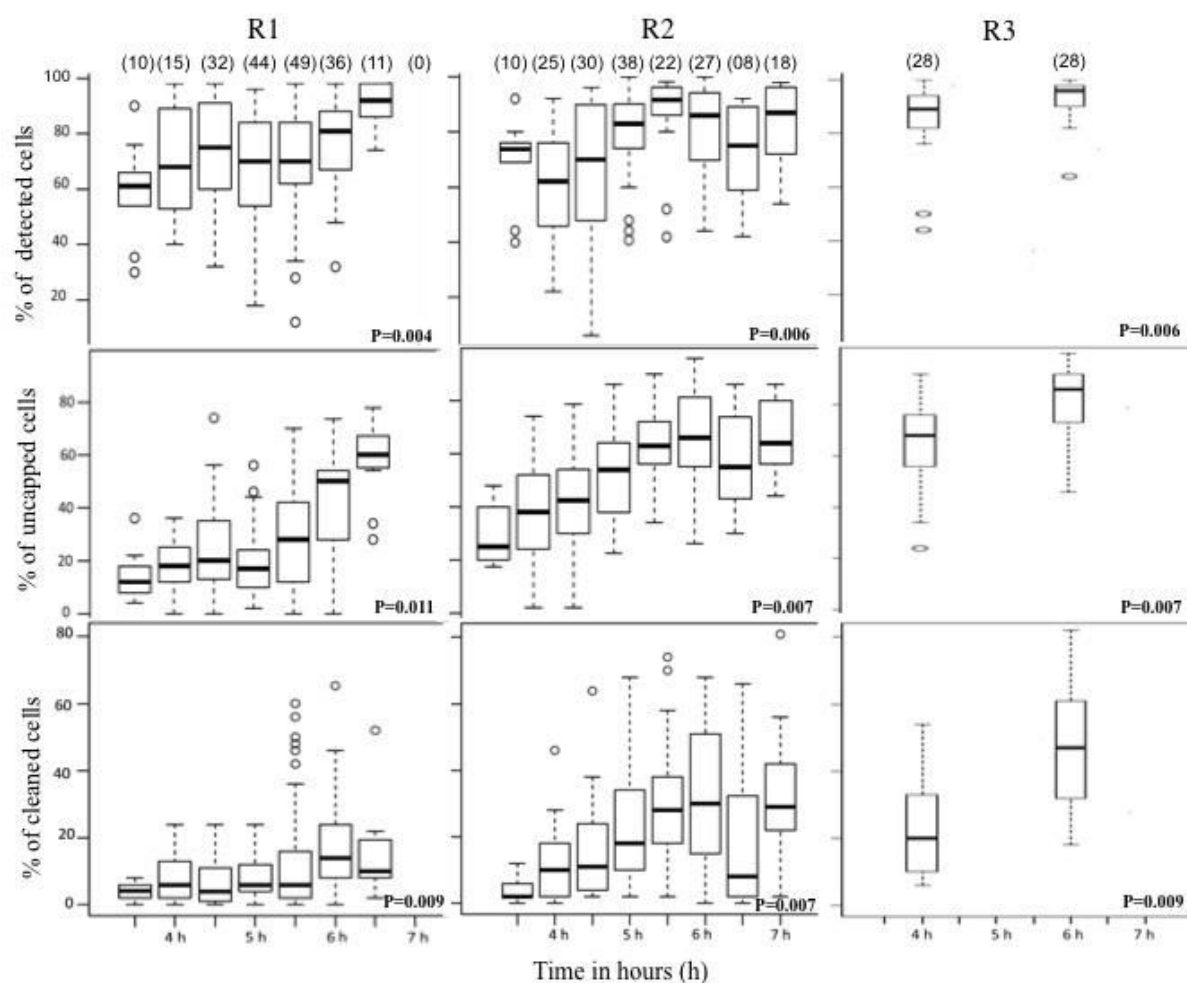


Figure 3. Hygienic responses of *A. m. unicolor* colonies indirectly measured by pin killing tests (at different hours after killing the brood). For each of the 3 regions (R1, R2 and R3) studied, percentages of detected, uncapped and cleaned cells recorded at different times after perforation and corresponding P value (GLM, $0.004 < P < 0.011$) are indicated. In R1 and R2, hygienic behavior of each colony has been measured once, in R3, the same colonies have been tested twice.

Table 1. Hygienic behavior responses 6h after pin-killing the brood. For each region are indicated, n: the number of colonies tested, range and mean \pm SD of the percentage of detected, uncapped and cleaned cells.

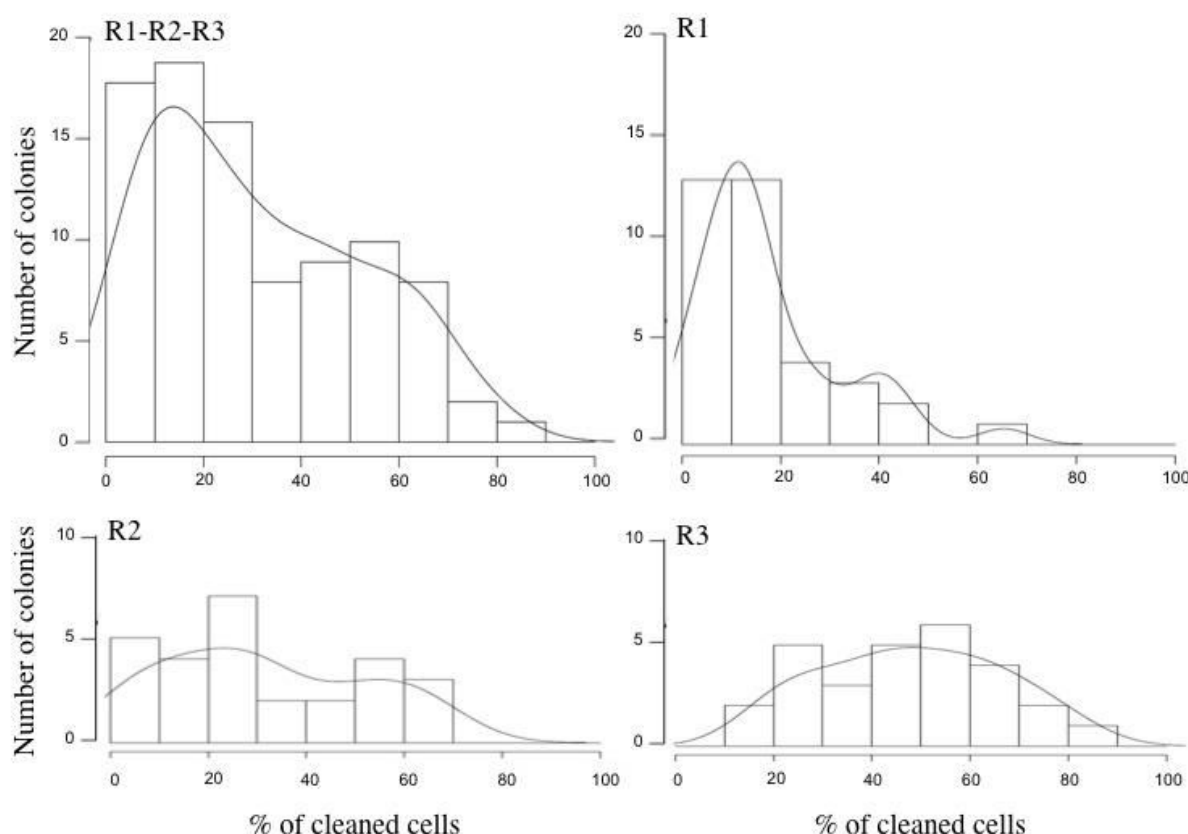
Regions	% of detected cells	% of uncapped cells	% of cleaned cells
Morondava (R1)	32 - 98	0 – 73	0 – 65
(n = 36)	Mean = 77 ± 15	Mean = 43 ± 20	Mean = 18 ± 15
Ambositra (R2)	44 – 100	26 – 96	0 – 68
(n = 27)	Mean= 82 ± 16	Mean = 68 ± 20	Mean = 32 ± 21
Antananarivo (R3)	64 – 100	46 – 100	18 – 82
(n = 28)	Mean = 93 ± 08	Mean = 82 ± 14	Mean = 48 ± 18

Distribution of the cleaned cells rate 6 h after perforation

The uni- vs multi-modal distribution tested by the Rebmix package showed that the distribution of the cleaned cells rate was considered as multimodal, covering a range of different classes (Figure 4). Among the 91 colonies examined 6 h after perforation, 58 % (N = 53) cleaned less than 30% of the perforated cells and were considered as class 1, 38% (N = 35) cleaned between 30 to 70% of perforated cells and were considered as class 2, and the 3% (N = 3) that cleaned more than 70% of the perforated cells as class 3 (Table 2).

Colonies from R1 (N = 36) displayed a cleaned cells distribution similar to that of the global distribution. R1 population had a great proportion of its colonies (72%) that cleaned less than 20% of perforated cells, while, in the infested region (R3), except two colonies that presented

a cleaned cells rate of 18%, all colonies were above 22% (Table 1, Figure 4). In R2, percentage of cleaned cells ranged from 0% to 68%. Proportions of colonies belonging to each class were significantly different between each pairwise region (Fisher test, P = 0.04 for



R1/R2, $1.008e^{-5}$ for R1/R3, and 0.01 for R2/R3).

Figure 4. Distribution of the percentage of cleaned cells 6 h after pin-killing brood, density curve was presented in each graph.

Table 2. Comparison of hygienic behavior responses of honey bee subspecies tested by the pin-killing method, H: hygienic colony, NH: non-hygienic colony.

Subspecies		Observation	Hygienic	% of detected	% of uncapped	% of cleaned	
honey bees	Countries	Time (s)	class	cells	cells	cells	References
<i>A. m. unicolor</i>	Madagascar (n=91)	6 h	class 1	32-100	0-94	0-30	This study
			class 2	64-100	42-100	32-70	
			class 3	94-100	90-98	76-82	
Africanized honey bee	Brazil (n=4)	6 h	H	100	100	58	(Morais et al., 2009)
			NH	~90	~78	8	
Africanized honey bee	Brazil (n=2)	6 h	H	-	-	~7-10	(Pereira et al., 2013)
			NH	-	-	~0-5	
Africanized honey bee	Argentina (n= 2)	9 h	H	-	100	~80	(Palacio et al., 2010)
			NH	-	90	~40	
Africanized honey bee	Brazil (n=36)	12 h	-	-	~30-46	~25-48	(Nicodemo et al., 2013)
<i>A. m. carnica</i>	Germany (n=1)	6 h	H	90	40	19	(Gramacho and Gonçalves, 2009)
			NH	77	24	11	
<i>A. m. carnica</i>	Germany (n=4)	6 h	H	-	100	64	(Palacio et al., 2005)
			NH	-	70	26	
European honey bee	Argentina (n=4)	6 h	-	-	-	1-31	(Gramacho, 1999)
European honey bee	Sweden (n=34)	12 h	-	-	-	15-20	(Locke and Fries, 2011)
		24 h	-	-	-	46-49	
European honey bee	Poland (n=12)	12 h	H	-	-	83	(Panasiuk et al., 2008)
			NH	-	-	62	
<i>A. m. scutellata</i>	Zimbabwe (n=11)	24 h	-	-	-	0-100	(Fries and Raina, 2003)

DISCUSSION

Based on the percentage of cleaned cells within 6 h, *A. m. unicolor* colonies were split in 3 classes according to the different distribution modes. Comparing with other subspecies tested after 6 h of pin-killing brood, Malagasy colonies from class 2 and class 3 were better at detecting, uncapping and removing damaged brood than those of European and some of the Africanized honey bee populations (Table 2). In hygienic European honey bee colonies, cleaned cells rate ranged from 19 to 31% in *A. m. carnica* (Gramacho and Gonçalves, 2009; Gramacho, 1999) and reached 64% according to Palacio et al. (2005). In hygienic colonies of Africanized honey bee, cleaned cells rate estimated with similar protocols ranged from 7 to 58 % (Morais et al., 2009; Nicodemo et al., 2013; Pereira et al., 2013).

When comparing to a broader range of studies (Table 2) for intermediate stages of HB, efficiency of Malagasy colonies at detecting and uncapping cells containing pin perforated brood was comparable to results reported from hygienic Africanized honey bee and was much higher than reported from European hygienic colonies. As suggested, the greater hygienic behavior efficiency probably lies in the quick detection of brood death (Masterman et al., 2001; Gramacho and Spivak, 2003). Our results suggest that workers of *A. m. unicolor* have not only a good ability to discriminate the various cues emanating from the dead brood or/and low thresholds to the stimulus but are also efficient at uncapping and removing dead brood from cells. Such an effective hygienic behavior had also been reported in the African subspecies *A. m. scutellata*; the removal rate reported 24 h after perforation was considerably higher than that reported from Africanized bees (Fries and Raina, 2003; Locke and Fries, 2011).

Significant hygienic variability was found between colonies from the 3 regions (percentage of cleaned cells ranged from 0 to 65% in R1, 0 to 68% in R2 and 18 to 82% in R3). Pin tests in our study were done at 2 different periods, winter (between April-October, R2) and summer (in November-March, R1 and R3) and a broad panel of climatic conditions and topography are observed in the 3 regions (Figure 1). Season, relative humidity and temperature have been shown to influence hygienic success of colonies (Couto and Couto, 2006; Uzunov et al., 2014). HB of a same subspecies (*A. cerana indica*) was found to be different in various eco habitats (Athreya and Reddy, 2013). So that, part of the variability between the hygienic responses observed between regions could be partly due to season, environment and climatic factors.

Moreover, PCA graph and overall means of F_{ST} showed significant neutral nuclear genetic differentiation between regions, indicating that gene flow is restricted between the three regions studied. Since HB is a heritable trait, differences between colonies of the same apiary and differences in the distribution of hygienic responses among regions could also be partly explained by origin and genetic diversity of colonies.

In the region infested by *V. destructor* (R3), very low levels of hygienic response were not found, all colonies cleaned at least 18% of the perforated cells within 6 h. Colonies harboring cleaned cells rate of 0 to 16% at 6 h are usually classified as non-hygienic (Morais et al., 2009; Palacio et al., 2005; Pereira et al., 2013) and are therefore highly susceptible to

varroatosis. Apiaries from this infested region suffered serious colony losses (about 60%) in surveyed apiaries one year before our pin tests (Rasolofoarivao et al., 2013). So, in R3, the absence of such non-hygienic colonies and the shift observed in the distribution of HB could be explained by directional natural selection favoring the most hygienic colonies.

Presence of highly hygienic colonies is a great opportunity to propose a breeding program to select for HB. This would help Malagasy beekeepers to reduce *V. destructor* incidence. Hygienic colonies could also present economic interests; they have been described as producing more honey and pollen (Spivak and Reuter, 2001, Nicodemo et al., 2013). Nevertheless, the actual degree of *V. destructor* tolerance of Malagasy colonies tested with the pin-killing method, still need to be evaluated in controlled tests, by challenging colonies with *V. destructor* mites. Indeed, other colony-level adaptive traits (grooming behavior, reduced mite reproduction ability...) may also influence the overall colony tolerance (Aumeier et al., 2000; Locke and Fries, 2011).

Acknowledgments

We are grateful to the Malagasy beekeepers who participated in this work. We thank the following people: Andrianaivoariseta Niaina, FENAM and FITAME associations for their help with data collection, Chiroleu Frédéric and Le Squin Sandrine for statistical help. This work is part of the PhD of Rasolofoarivao Henriette recipient of a grant of CIRAD-AIRD-Sud. Field work had been partly funded by CIRAD, the Enlargement and sustainability of the Plant Protection Network (ePRPV) project, the European Union, the French government, and Réunion collectivities.

References

- Athreya S, Reddy M (2013). Variation of hygienic behaviour (nest cleaning behaviour) in honey bee, *Apis cerana indica* F. in different eco habitats of South India. *Current Biotica* 7:101-104.
- Aumeier P, Rosenkranz P, Gonçalves LS (2000). A comparison of the hygienic response of Africanized and European (*Apis mellifera carnica*) honey bees to *Varroa*-infested brood in tropical Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 23:787-791.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. *Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR 5000*:1996-2004.
- Boecking O, Spivak M (1999). Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 30:141-158.
- Couto RHN, Couto LA (2006). *Apicultura: manejo e produtos*. Funep. Jaboticabal
- Franck P, Garnery L, Loiseau A, Oldroyd B, Hepburn H, Solignac M, Cornuet JM (2001). Genetic diversity of the honey bee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity* 86:420-430.
- Fries I, Camazine S, Sneyd J (1994). Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: a model and a review. *Bee World*.
- Fries I, Raina S (2003). American foulbrood and African honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 96:1641-1646.
- Ganzhorn JU, Lowry PP, Schatz GE, Sommer S (2001). The biodiversity of Madagascar: one of the world's hottest hotspots on its way out. *Oryx* 35:346-348.
- Garnery L, Cornuet JM, Solignac M (1992). Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol. Ecol.* 1:145-154.
- Gramacho KP (1999). *Fatores que interferem no comportamento higiênico das abelhas Apis mellifera*. Ph.D. thesis, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.
- Gramacho KP, Gonçalves LS, Rosenkranz P, David D (1999). Influence of body fluid from pin-killed honey bee pupae on hygienic behavior. *Apidologie* 30:367-374.
- Gramacho KP, Spivak M (2003). Differences in olfactory sensitivity and behavioral responses among honey bee bred for hygienic behavior. *Ecol. Sociobiol.* 54:472-479.
- Gramacho KP, Gonçalves L (2009). Sequential hygienic behavior in Carniolan honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Genet. Mol. Res.* 8:655-663.
- Gregorc A, Lokar V (2011). Selection criteria in an apiary of Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica*) colonies for queen rearing. *Journal of Central European Agriculture* 11.

- Guerra Jr JCV, Gonçalves LS, Jong DD (2000). Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) are more efficient at removing worker brood artificially infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans than are Italian bees or Italian/Africanized hybrids. *Genet. Mol. Biol.* 23:89-92.
- Johnson RM, Ellis MD, Mullin CA, Frazier M (2010). Pesticides and honey bee toxicity—USA. *Apidologie* 41:312-331.
- Jombart T (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24:1403-1405.
- Latreille P (1804). Notice des espèces d'abeilles vivant en grande société, ou d'abeilles proprement dites, et description d'espèces nouvelles. *Ann Mus Natl Hist Nat* 5:161-178.
- Locke B, Fries I (2011). Characteristics of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Sweden surviving *Varroa destructor* infestation. *Apidologie* 42:533-542.
- Lodesani M, Costa C, Man MC (2009). Limits of chemotherapy in beekeeping: development of resistance and the problem of residues. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Animal Science and Biotechnologies* 62.
- Masterman R, Ross R, Mesce K, Spivak M (2001). Olfactory and behavioral response thresholds to odors of diseased brood differ between hygienic and non-hygienic honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A* 187:441-452.
- Mittermeier RA, Turner WR, Larsen FW, Brooks TM, Gascon C (2011). Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. *Biodiversity hotspots*. Springer, pp. 3-22.
- Morais M, Franco T, Pereira R, De Jong D, Gonçalves L (2009). Africanized honey bees are efficient at detecting, uncapping and removing dead brood. *Genet. Mol. Res.* 8:718-724.
- Nagode M, Fajdiga M (2011). The rebmix algorithm and the univariate finite mixture estimation. *Communications in Statistics-Theory and Methods* 40:876-892.
- Nicodemo D, De Jong D, Couto R, Malheiros E (2013). Honey bee lines selected for high propolis production also have superior hygienic behavior and increased honey and pollen stores. *Genet. Mol. Res.* 12:6931.
- Palacio MA, Figini E, Ruffinengo S, Rodriguez E, Gonçalves LS, Del Hoyo ML, Bedascarrasbure E (2000). Changes in population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behavior and its relation to disease tolerance. *Apidologie* 31:471-478.
- Palacio MA, Flores JM, Figini E, Ruffinengo S, Escande A, Bedascarrasbure E, Rodriguez E, Gonçalves LS (2005). Evaluation of the time of uncapping and removing dead brood from cells by hygienic and non-hygienic honey bees. *Genet. Mol. Res.* 4:105-114.
- Palacio MA, Rodriguez E, Gonçalves LS, Bedascarrasbure E, Spivak M (2010). Hygienic behaviors of honey bees in response to brood experimentally pin-killed or infected with *Ascosphaera apis*. *Apidologie* 41:1-11.

- Panasiuk B, Skowronek W, Bieńkowska M (2008). Influence of genotype and method of brood killing on brood removal rate in honey bee. *J. Apic. Sci.* 52:55-65.
- Pereira RA, Morais MM, Franco TM, Gonçalves LS (2013). Hygienic Behavior of Africanized Honey Bees *Apis mellifera* Directed towards Brood in Old and New Combs during Diurnal and Nocturnal Periods. *Insects* 4:521-532.
- Rasolofoarivao H, Clémencet J, Ravaomanarivo LHR, Razafindrazaka D, Reynaud B, Delatte H (2013). Spread and strain determination of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in Madagascar since its first report in 2010. *Exp. Appl. Acarol.* 60:521-530.
- Rothenbuhler WC (1964). Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. *Anim. Behav.* 12:578-583.
- Solignac M, Vautrin D, Loiseau A, Mougél F, Baudry E, Estoup A, Garnery L, Habert M, Cornuet JM (2003). Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Mol. Ecol. Notes* 3:307-311.
- Spivak M (1996). Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 27:245-260.
- Spivak M, Gilliam M (1998). Hygienic behavior of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. *Bee World* 79:169-186.
- Spivak M, Reuter GS (2001). Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* 32:555-565.
- Uzunov A, Costa C, Panasiuk B, Meixner M, Kryger P, Hatjina F, Bouga M, Andonov S, Bieńkowska M, Le Conte Y (2014). Swarming, defensive and hygienic behaviour in honey bee colonies of different genetic origin in a pan-European experiment. *J. Apic. Res.* 53:248-260.
- Weir BS, Cockerham CC (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evol.* 38:1358-1370.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Madagascar (y compris les îles de l'océan Indien) figure parmi les cinq premiers zones « *hot spots* » prioritaires pour la conservation de la biodiversité mondiale (Myers *et al.* 2000 ; Mittermeir, 2011). Par sa flore mellifère abondante et variée Madagascar est désignée comme pays à vocation apicole (Cite, 2004 ; 2009). L'abeille endémique *A. m. unicolor* occupe tous les milieux, quel que soit le type de climat et la topographie (Ralalaharisoa-Ramamonjisoa, 1996).

Les milieux isolés, tels que les îles, sont fragiles et plus susceptibles aux invasions des espèces exotiques (Molles, 2005). Depuis 2010, l'arrivée de *V. destructor* à Madagascar (OIE-Fév- 2010) est en train de modifier les équilibres écologiques. Nos objectifs sont multiples : mieux appréhender la diversité génétique de l'abeille *A. m. unicolor*, estimer son seuil de tolérance à *V. destructor*, déterminer les voies d'introduction de *V. destructor* dans l'île et sa dynamique d'invasion depuis sa première description, pour finalement proposer un protocole de testage en vue d'un programme de sélection de souches tolérantes à cet ectoparasite.

Diversité génétique de l'abeille *A. m. unicolor*

Nos résultats basés sur l'ADN mitochondrial confirment qu'*A. m. unicolor* fait partie de la lignée évolutive africaine A (Chapitre 2). Seule cette lignée a été détectée dans notre échantillonnage couvrant la majorité des régions administratives (18/22) de Madagascar. Au sein de cette lignée, le profil A1 est très majoritaire (99.59 %) avec une forte diversité de séquences observée (n=16), suivi par le profil A4 typique de la sous-espèce, *A. m. scutellata*, en forte minorité (0.41%, n = 3 individus). *Apis mellifera unicolor* se rapproche par son comportement et sa morphologie d'*A. m. scutellata*, une autre sous espèce africaine. En effet ces deux sous-espèces sont classées parmi les abeilles tropicales, de petites tailles, qui essaient ou désertent facilement (Ruttner, 1988). Toutefois elles sont différentes. *Apis mellifera scutellata* est une abeille de savanes de Hauts Plateaux à 2400 m d'altitude qui se repartie à l'Est et au Sud de l'Afrique, reconnue par sa couleur jaune et son comportement très agressif. *Apis mellifera unicolor* a été définie comme une sous-espèce distincte, qui a évolué en isolement à Madagascar. Ruttner (1988) a décrit au sein de cette sous-espèce 2 écotypes différents. Notre résultats de génétique et ceux de l'étude de comportement phénotypique de Ramamonjisoa et ses collègues (1996) ne corroborent pas cette sous classification.

Notre étude menée sur la population d'abeille *A. m. unicolor* à Madagascar a montré une faible diversité nucléaire (H_e (Hétérozygotie attendue) = 0.34 - 0.47, nb (nombre d'allèles moyen) = 2.47 - 3.88) par rapport aux autres sous-espèces africaines (Chapitre 2). Plusieurs types de facteurs sont à prendre en considération pour sa faible diversité, qu'ils soient d'ordre biologique, ou anthropique.

Deux études ont montré que les populations d'abeilles africaines (*A. m. intermissa*, *A. m. scutellata* et *A. m. capensis*) se caractérisent par une diversité nucléaire importante par rapport à l'abeille européenne (*A. m. mellifera*, *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* et *A. m. cecropia*) (Estoup *et al.*, 1995; Franck *et al.*, 2001). Cette diversité s'expliquerait surtout par la forte

taille efficace de la population (Estoup et al., 1995; Franck et al., 2001). En Afrique, une forte tendance de migration saisonnière de l'abeille a été observée, ce qui pourrait faciliter le flux de gènes entre les populations, de plus, la majorité des apiculteurs des pays africains se base sur la capture des essaims sauvages (Dietemann et al., 2009) ce qui limiterait la perte de diversité génétique. A Madagascar, les populations d'*A. m. unicolor* pourraient être moins mobiles que les autres sous espèces africaines en raison de la topographie de l'île et du large panel de variations climatiques entre les régions ce qui limiterait les flux de gène. Du point de vue des pratiques apicoles, certains apiculteurs malgaches ont tendance à multiplier leurs colonies par essaimage artificiel (Cite, 2004 ; 2009), les colonies filles sont alors toutes de même origine; cette pratique apicole homogénéise le cheptel d'abeille.

Il a été montré que la diversité d'une espèce est généralement plus faible au sein des populations peu nombreuses ou subissant un goulot d'étranglement⁷ comparée à des populations de grande taille, ce qui est le cas de notre sous-espèce vivant en isolation face à une abeille sur le continent. En effet, un faible effectif de population peut induire une perte de diversité allélique et/ou engendrer la fixation de certains allèles (Keller and Waller, 2002).

Malgré sa faible diversité, il existe, à l'échelle de l'île, une structuration génétique faible en deux sous clusters. La barrière topographique (Hauts Plateaux *versus* côtes basses) entre les régions pourrait expliquer cette différenciation. Cependant, des mélanges de d'abeilles issues de différentes populations peuvent avoir eu lieu, en particulier dans la région de la capitale. En effet, à Madagascar, la plupart du transit des marchandises se font dans la capitale, les voies de communication sont limitées, mais toutes mènent vers la capitale. Ainsi, le marché central et les échanges commerciaux libres faciliteraient la dispersion de l'abeille.

Impacts de *V. destructor* à Madagascar

Nous avons estimé de 48 à 100% les pertes de colonies au sein des ruchers au cours d'une année dans une région à Madagascar après 2 ans d'introduction de *V. destructor* (Chapitre 3).

L'acarien *V. destructor* contribue directement (par spoliation) et indirectement (par transmission de virus) à d'importantes mortalités dans les populations de son hôte *Apis mellifera* (Neumann and Carreck, 2010). Un suivi au niveau mondial révèle que l'expansion rapide de *V. destructor* est associée à un déclin important de l'abeille (Neumann and Carreck, 2010). Des taux extrêmes de mortalité pouvant atteindre 85% pour certaines colonies domestiques (observés au Moyen Orient, Haddad et al., 2009; Soroker et al., 2009), et jusqu'à 95% pour les colonies sauvages ont été reportés (Kraus and Page, 1995; Finley et al., 1996; Loper, 1997; Page, 1998; Hunt, 1998).

Toutefois, aucune cause unique n'a été identifiée pour expliquer le « syndrome d'effondrement des colonies » ou CCD⁸ mais *V. destructor* et ses pathogènes associés sont parmi les causes centrales (Currie et al., 2010; Le Conte et al., 2010; Neumann and Carreck, 2010, vanengelsdorp, 2010). Le CCD se définit comme une disparition anormale et massive

⁷ Goulot d'étranglement ou « Bottleneck »: facteur extrinsèque à l'espèce qui vient diminuer l'effectif de la population d'origine

⁸ CCD : Colony Collapse Disorder

de la colonie d'abeille (Oldroyd, 2007), un phénomène très répandu en Europe et aux Etats-Unis.

Chez les sous espèces d'abeilles africaines, à moyen terme, aucun impact négatif grave sur la survie de l'abeille, la production, le rendement en miel n'a été signalé en Afrique de l'Est au début de l'infestation (Fazier et al., 2010). Pour l'Afrique du Sud, des pertes importantes de colonies ont été observées uniquement au début de l'introduction du *V. destructor*, il a été observé un phénomène de tolérance à partir de 3 à 5 ans chez *A. m. capensis* et 6 à 7 ans pour *A. m. scutellata* (Allsop, 2007). Récemment, il a été démontré que les sous-espèces africaines et leurs hybrides africanisés sont moins sensibles aux effets de l'ectoparasite *V. destructor* (Corréa –Marquez, 2002 ; Allsop, 2007). La tolérance d'*A. m. capensis* serait surtout due à une durée de l'operculation très courte qui freinerait la reproduction et rendrait la femelle de l'ectoparasite infertile (Allsop, 2007).

A Madagascar, malgré l'épisode de fortes pertes de colonies, il semblerait (à dire d'apiculteurs) que les colonies reprennent de la vigueur en particulier dans l'axe capitale- côte Est. On pourrait donc penser que les populations d'abeilles s'adaptent rapidement à leur nouveau parasite, par plasticité phénotypique et/ou contre-sélection des colonies les moins tolérantes.

Dynamique de propagation, la voie d'introduction et diversité génétique de *V. destructor*

La propagation de *V. destructor* à Madagascar ne dépasse pas les 80 km au-delà des zones initialement infestées (Chapitre 2). Cette faible propagation pourrait être liée à l'insuffisance des voies de communication qui pourrait freiner la transhumance sur de longues distances et le transport d'abeilles vivantes entre les districts. Dans chaque district ou région administrative, en général, l'apiculture est gérée par une association locale, cette dernière ravitaille le matériel apicole (de type artisanal et propre à chaque région) ce qui limiterait l'échange du matériel d'élevage inter-régions. De plus, la propagation de *V. destructor* par voie naturelle (ex essaimage, vol nuptial de la reine, butinage des ouvrières, pillage, ...) est limitée par la présence de barrières géographique telles les chaînes de montagnes entre les Hauts Plateaux et les côtes ou la présence de surface semi-désertique entre les Hauts Plateaux et le Sud (C.f. étude bibliographie : biogéographie de Madagascar).

Lors de la détection de *V. destructor* au Kenya et en Tanzanie en 2009, il était déjà présent dans 18 sites distants de plus de 650 km (Fazier et al., 2010). En Afrique du Sud (infesté en 1997, de superficie 2 fois plus grande que Madagascar), l'acararien a, en cinq ans, atteint plus de 83 régions sur l'ensemble du pays (Allsop, 2007). Cette propagation rapide s'expliquerait, entre autres, par l'infestation des colonies sauvages (nombreuses, mobiles et difficilement contrôlables) (Allsop, 2007).

Cet ectoparasite se disperse aussi aux grés des migrations saisonnières de l'abeille, des transhumances et des échanges commerciaux. Si *V. destructor* peut survivre pendant un certain délai (Guzzman et al., 1993), l'échange de matériel apicole contaminé pourrait donc favoriser sa dispersion d'une région à une autre.

Le typage génétique de *V. destructor* à Madagascar montre une lignée génétique identique à la lignée la plus répandue au monde, celle de l'haplotype « coréen » (K1), capable d'infester toutes les races d'abeilles européennes (Büchler et al, 2010), les sous-espèces pures africaines (Allsop, 2007 ; Fazier, 2010) et les races « africanisées » (Corréa –Marquez, 2002). De plus, nos résultats ont montré que cet ectoparasite présente très peu de variabilité génétique nucléaire et un niveau très faible en hétérozygotie (Chapitre 3). Cette faible diversité pourrait être expliquée par une arrivée récente (OIE-2010) d'un nombre réduit de spécimens, induisant un goulot d'étranglement lié à un effet de fondation. De plus le mode de reproduction de type adelphogamie (reproduction sexuée entre frère-sœurs) pour la production des femelles, associé à la production pseudo-arrhénotoque des individus mâles par les femelles fondatrices, favorisent la fixation des allèles, conduisant à une quasi- clonalité des individus au sein des populations, et n'est pas en faveur de la brassage génétique (Solignac et al., 2005; Martin et al., 1997 ; Ruijter and Papas, 1983).

En effet, un événement de colonisation pourrait être constitué d'une seule femelle et pourraient ainsi suffire à fonder une nouvelle population clonale dans un milieu nouvellement colonisé puisque une femelle fécondée peut engendrer 5 à 6 individus par cycle reproductif (Garrido and Rozenkraz, 2003 ; Martin 1994, 1995).

Compte tenu de la diversité génétique observés (8 MLGs, très proches génétiquement), deux hypothèses non exclusives peuvent être proposées pour expliquer un tel résultat, i) soit la population de *V. destructor* est issue d'une ou plusieurs femelles ayant le même génotype, les 7 autres étant apparus par mutation après l'introduction, ii) soit des fondatrices ayant des génotypes différents ont été introduites, certains génotypes, plus rares, pourrait avoir apparus post introduction.

De plus, des mutations au niveau de la taille de certains allèles pour trois loci ont été remarquées, de telles mutations à des locis non-neutres pourraient favoriser une adaptation locale des populations d'acariens aux différentes conditions climatiques et permettre une adaptation rapide de la souche pour les populations d'abeilles.

La majorité des acariens testés (70%) possède le même génotype, ainsi, tous les différents types de génotypes observés (8 MLGs) sont trouvés dans les districts de la capitale. On peut penser que *V. destructor* a été introduit par voie aérienne dans un ou quelques ruchers de la capitale proche de l'aéroport international et s'est répandu vers les districts voisins et la côte Est par échanges commerciaux ou matériels contaminés.

Solutions pour lutter contre le *V. destructor*

Pour faire face à l'invasion de *V. destructor*, un plan d'intervention d'urgence a été mis en place à Madagascar (elevage, 2010). Dans ce plan, il était question de la déclaration obligatoire par l'apiculteur de la varroase. Le transport de colonies, de reines, de paquets d'abeilles ou de matériel apicole entre les districts a été strictement interdit, suivi de la destruction des colonies et des ruches contaminées (sans indemnisation prévue par le gouvernement). Non convaincus par ces mesures, la plupart des apiculteurs a préféré d'autres

moyens de contrôle. Leur technique est basée sur deux méthodes, la première est l'usage des moyens mécaniques par l'élimination des couvains mâles ou la destruction des colonies faibles, la deuxième consiste à l'utilisation de méthodes de traitement chimiques. Les traitements sont surtout basés sur l'utilisation d'extrait de plantes comme le thym, la feuille de tabac et d'autres produits comme l'huile essentiel de thym, l'ail, Les produits acaricides tels l'amitraz, le thymol, l'Apivar, etc... n'ont été conseillés et homologués que deux années après l'arrivée du *V. destructor* (en 2012) à Madagascar.

D'après (Imdorf et al., 2003) ses collègues (2003), pour les cas des abeilles européennes, la surveillance régulière de la population de *V. destructor* est la mesure appliquée, cette mesure permet de déceler à temps une éventuelle augmentation de la population de parasite et d'y affecter des mesures des luttés qui s'imposent. Parmi les mesures biotechniques, la formation de nucléi et le découpage du couvain mâle sont intégrées dans la conduite du rucher, le traitement chimique (ex : acide oxalique, acide formique,...) est appliqué dès que la colonie est exempte du couvain.

Comportement hygiénique de l'abeille *A. m. unicolor*

Des comportements adaptatifs permettant aux espèces hôtes de se défendre contre les parasites sont diverses, ainsi, certaines colonies essaient et désertent pour se prémunir de l'infestation (Fries et al., 2003; Wilde et al., 2005). D'autre part, la sélection naturelle élimine naturellement les colonies sensibles (Rosenkranz et al., 2010) ainsi une colonie ayant une forte capacité de nettoyage a une chance de survivre malgré le fort degré d'infestation (Spivak and Reuter, 2001).

Nous avons suivi des colonies de 3 régions à Madagascar (Hauts Plateaux infestées par *V. destructor* depuis 2 ans, et les deux autres encore indemnes de *V. destructor* (Chapitre 4). Les réponses hygiéniques ont été classées en trois catégories en fonction du niveau de nettoyage de la colonie. Basée sur le pourcentage des cellules nettoyées après 6 h de test à l'aiguille, l'efficacité des colonies d' *A. m. unicolor* à détecter et à désoperculer les cellules operculées était comparable à celles des abeilles hygiéniques africanisées (Morais et al., 2009; Nicodemo et al., 2013; Pereira et al., 2013) et était beaucoup plus élevée que celle des abeilles européennes (Gramacho and Gonçalves, 2009).

Toutefois, nous avons observé une forte hétérogénéité des réponses hygiéniques entre les 3 régions géographiques. Le comportement hygiénique est en effet connu pour être fortement influencé par différents facteurs (Athreya and Reddy, 2013). Ainsi le fait que certaines colonies aient déjà été en contact avec *V. destructor*, l'environnement et les facteurs climatiques pourraient en partie expliquer ces différences. Les différences entre les colonies issues de différentes régions pourraient aussi s'expliquer en partie par la différence du point de vue origine et de la diversité génétique des colonies.

Dans les ruchers testés sur les Hauts Plateaux, qui ont subi des pertes de colonies graves (environ 60%) un an avant notre test, nous avons remarqué une absence de colonies classées comme non hygiéniques (selon la littérature). Ce phénomène pourrait être expliqué par la sélection naturelle qui élimine les colonies non hygiéniques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La grande diversité des conditions climatiques et milieux naturels, associée à l'isolation de l'île ont favorisé la mise en place d'une flore extrêmement diversifiée à 80% endémique (Ganzhorn et al., 2001). Malgré sa faible diversité génétique, l'abeille endémique *A. m. unicolor*, fortement liée à son environnement pourrait contribuer au maintien de cette diversité. Les milieux insulaires sont fragiles et plus susceptibles aux invasions biologiques (Molles, 2005), l'arrivée de *V. destructor* à Madagascar (OIE- Fév- 2010) est en train de modifier les équilibres aussi bien dans les ruches que dans le milieu naturel. Malgré les dégâts apportés sur le cheptel malgache, sa vitesse de propagation semble lente et certaines populations d'*A. m. unicolor* montrent une forte capacité de nettoyage qui est un comportement crucial pour faire face à la varroase. Un protocole de testage du comportement hygiénique en vue d'un programme de sélection de souches tolérantes à cet ectoparasite a été proposé.

Du fait d'un échantillonnage basé uniquement sur les colonies domestiques, la diversité génétique observée pour *A. m. unicolor* pourrait être biaisée et inférieure à la diversité génétique globale de la population. Une étude complémentaire basée sur les essaims sauvages issus des zones protégées devrait être réalisée. Toutefois les pratiques apicoles d'enruchage des essaims sauvages et les quelques colonies sauvages récoltées dans des zones naturelles ne nous portent pas à conclure à une diversité significativement plus forte.

Pour l'instant, la faible diversité observée représente un élément notable à considérer qui pousse vers une idée de conservation de cette espèce.

Le passage de *V. destructor* chez les populations d'abeilles sauvages est à craindre du fait du rôle pollinisateur des abeilles, tant pour les espèces endémiques que pour les espèces d'intérêt agricole. En effet, son impact sur la production agricole est à considérer car faute de pollinisateur efficace, la production peut fortement baisser. C'est le cas de la production de litchi (dont Madagascar est un grand exportateur de Litchi en particulier dans la côte Est) (Stern and Gazit, 1996), et des cultures maraichères nécessitant des pollinisateurs généralistes (Gallai et al. 2009).

Pour préserver la valeur de Madagascar en tant que patrimoine mondial, il est important de prendre des mesures contre le *V. destructor* et de promouvoir la protection de l'espèce endémique *A. m. unicolor*. Conserver les colonies d'abeilles sauvages aux niveaux des aires protégées ou des corridors biologiques pourrait être une solution durable afin de sauvegarder la survie et diversité génétique de l'espèce.

Des solutions à long terme contre *V. destructor* devraient être prises en compte, en effet, outre le coût élevé des produits acaricides par rapport au pouvoir d'achat de l'apiculteur malgache, les effets indésirables de la pratique de produits chimiques sur l'abeille et les produits de la ruche découragent aussi l'utilisation de ces acaricides. Afin de diminuer le contrôle par acaricide en ne l'utilisant que lorsqu'il est nécessaire, la recherche de souche d'abeilles

tolérantes au *V. destructor* qui est du domaine de la sélection génétique est un avenir important pour combattre cet ectoparasite.

Pour que la sélection soit efficace, il faut que la méthode de détection des critères à développer soit fiable et rigoureuse et le caractère recherché fortement héritable, ce comportement doit relativement se retrouver sur la descendance. Outre le coût moins onéreux de test à l'aiguille utilisé, l'hérédité du comportement hygiénique a été prouvée par des analyses génétiques (ex : Boecking et al., 2000; Oxley et al., 2010; Zakar et al., 2014), l'apiculteur pourrait repérer ces colonies et faire une sélection empirique des meilleures reines.

La présence de colonies fortement hygiéniques dans les colonies testées dans cette thèse montre l'intérêt de proposer un programme de sélection (ou des formations aux apiculteurs sur ce critère de sélection) pour le cheptel malgache. Néanmoins, puisque le comportement hygiénique est fortement influencé par les conditions environnementales et par d'autres facteurs abiotiques, évaluer le comportement hygiénique de la colonie à nettoyer les couvains endommagés par le *V. destructor* serait une étape préalable obligatoire pour s'assurer que l'abeille en question présente ce caractère.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse avaient pour objectif de valider du protocole de test, afin de diminuer le nombre d'intervention qui risque de perturber et faire désertir la colonie. Puisque nous avons trouvé une large gamme de réponse hygiénique à 6 h, avec certaines colonies déjà fortement nettoyeuse (82% de cellules nettoyées complètement), il serait mieux pour la future étude de tester la colonie après 6 h de test à l'aiguille et en parallèle tester le niveau d'infestation de *V. destructor* entre les colonies dans les zones infestées. Ceci nous donnerait une idée plus précise de la relation entre la réponse au test à l'aiguille et la tolérance de la colonie vis-à-vis du *V. destructor*.

Finalement, la tolérance de l'abeille est due à des combinaisons de plusieurs paramètres à la fois biologiques et comportementaux. Outre l'étude du comportement hygiénique, il est nécessaire d'approfondir la biologie de l'abeille *A. m. unicolor* afin de mieux appréhender toutes les défenses naturelles possibles pour faire face contre le parasite.

L'interdiction de toute forme d'importation des abeilles vivantes ainsi qu'une quarantaine devrait être mise en place afin d'empêcher de multiples introductions de *V. destructor*. Outre les impacts de la spoliation et la mutilation, *V. destructor* sert de vecteur à de nombreux pathogènes (Bowen-Walker and Gunn, 2001) en particulier le virus des ailes déformées (DWV) et celui de la paralysie aigüe (APV, Martin et al., 2001). La mortalité des colonies d'abeilles sévèrement infestées par *V. destructor* est souvent attribuée à l'action délétère concomitante de virus (Genersch and Aubert, 2010).

Un projet en cours vise à analyser les virus en particulier ceux associés à *V. destructor* présent dans les abeilles issues des zones infestées et non infestées.

Finalement, la lutte contre le *V. destructor*, arrivé à Madagascar accidentellement ou délibérément, nécessite d'importants efforts de collaboration et de partenariats entre les différents intervenants concernés.

REFERENCES

Les références bibliographiques qui suivent correspondent à celles de l'introduction études bibliographies et de la discussion générale de thèse.

- Akimovia, L. Zaloznaya, I. Piletskaya (1986) Arrhénotokie et différenciation du sexe dans la ponte de l'acarien *Varroa jacobsoni*. Vestnik Ceskoslovenske Spolecnosti Zoologicke 4, 64-68
- Alburaki, M., B. Bertrand, H. Legout, S. Moulin, A. Alburaki, W.S. Sheppard, L. Garnery (2013) A fifth major genetic group among honey bees revealed in syria. BMC genetics 14, 117
- Allsopp, M.H. (2007) Analysis of *Varroa destructor* infestation of southern african honey bee populations.
- Athreya, S., M. Reddy (2013) Variation of hygienic behaviour (nest cleaning behaviour) in honey bee, *Apis cerana indica* f. In different eco habitats of South India. Current Biotica 7, 101-104
- Bailey, L. (1969) Signs of adult bee diseases. Bee world,
- Barbier, E. (1964) Pollinisation et fructification du clémentinier. Ann Abeille 7, 63-80
- Beetsma, J. (1979) The process of queen-worker differentiation in the honey bee. Bee world,
- Behrens, D., Q. Huang, C. Geßner, P. Rosenkranz, E. Frey, B. Locke, R.F. Moritz, F. Kraus (2011) Three QTL in the honey bee *Apis mellifera* l. Suppress reproduction of the parasitic mite *Varroa destructor*. Ecology and evolution 1, 451-458
- Boecking, O., E. Genersch (2008) Varroosis the ongoing crisis in bee keeping. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 3, 221-228
- Boecking, O., W. Ritter (1993) Grooming and removal behaviour of *Apis mellifera intermissa* in tunisia against *Varroa jacobsoni*. Journal of Apicultural Research (United Kingdom),
- Boecking, O., M. Spivak (1999) Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* oud. Apidologie 30, 141-158
- Boot, W.J., J.N. Calis, J. Beetsma (1992) Differential periods of varroa mite invasion into worker and drone cells of honey bees. Experimental & applied acarology 16, 295-301
- Bowen-Walker, P.L., A. Gunn (2001) The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honey bee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. Entomologia Experimentalis et Applicata 101, 207-217

- Bozina, K. (1961) How long does the queen live. *Pchelovodstvo* 38, 117
- Brouwers, E., R. Ebert, J. Beetsma (1987) Behavioural and physiological aspects of nurse bees in relation to the composition of larval food during caste differentiation in the honey bee. *Journal of Apicultural Research*,
- Büchler, R. (1993) Rate of damaged mites in natural mite fall with regard to seasonal effects and infestation development. *Apidologie (France)*,
- Büchler, R., S. Berg, Y. Le Conte (2010) Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe. *Apidologie* 41, 393-408
- Büchler, R., W. Drescher (1990) Variance and heritability of the capped developmental stage in european *Apis mellifera l.* and its correlation with increased *Varroa jacobsoni* oud. Infestation. *Journal of Apicultural Research* 29, 172-176
- Calderón, R., J. Van Veen, M. Sommeijer, L. Sanchez (2010) Reproductive biology of *Varroa destructor* in africanized honey bees (*Apis mellifera*). *Experimental and Applied Acarology* 50, 281-297
- Calderone, N., G. Robinson, R. Page Jr (1989) Genetic structure and division of labor in honey bee societies. *Experientia* 45, 765-767
- Celan, E. (1971) La paralysie infectieuse. *La Belgique Apicole* 11, 275-277
- Chen, Y.P., R. Siede (2007) Honey bee viruses. *Advances in virus research* 70, 33-80
- Cole, B.J. (1983) Multiple mating and the evolution of social behavior in the hymenoptera. *Behavioral ecology and sociobiology* 12, 191-201
- Cook, J.M. (1993) Sex determination in the hymenoptera: A review of models and evidence. *HEREDITY-LONDON-* 71, 421-421
- Council, B.M.D. (2013) Swarms of honey bees.
- Crane, E. (1990) Bees and beekeeping: Science, practice and world resources, Heinemann Newnes
- Crozier, R., R. Page (1985) On being the right size: Male contributions and multiple mating in social Hymenoptera. *Behavioral ecology and sociobiology* 18, 105-115
- Currie, R., P. Gatién (2006) Timing acaricide treatments to prevent varroa destructor (acari: Varroidae) from causing economic damage to honey bee colonies. *The Canadian Entomologist* 138, 238-252
- De Guzman, L.I., T.E. Rinderer (1999) Identification and comparison of Varroa species infesting honey bees. *Apidologie* 30, 85-95

- De Guzman, L.I., T.E. Rinderer, L.D. Beaman (1993) Survival of *Varroa jacobsoni* Oud.(Acari: Varroidae) away from its living host *Apis mellifera* L. Experimental & applied acarology 17, 283-290
- De Ruijter, A., J. Kaas (1983) The anatomy of the varroa mite. *Varroa jacobsoni* Oud Affecting honey Bees: Present Status and Needs AA Balkema, Rotterdam, 45-47
- Denmark, H.A., H.L. Cromroy, L. Cutts (1991) Varroa mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans:(Acari: Varroidae), Fla. Department Agric. & Consumer Serv., Division of Plant Industry
- Dietemann, V., A. Lubbe, R.M. Crewe (2006) Human factors facilitating the spread of a parasitic honey bee in South Africa. Journal of economic entomology 99, 7-13
- Dietz, A. (1982) honey bees. Social insects 3, 323-360
- Donzé, G., P.M. Guerin (1994) Behavioral attributes and parental care of Varroa mites parasitizing honey bee brood. Behavioral ecology and sociobiology 34, 305-319
- Dorland (1990) Dorland's illustrated medical dictionary. 1940
- Duay, P., D. De Jong, W. Engels (2002) Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. Genet Mol Res 1, 227-232
- Ehrhardt, K., N. Reinsch, R. Büchler, C. Garrido, K. Bienefeld Genetic parameters for Varroa resistance in the honey bee. In: 40th Apimondia International Apicultural Congress, 2007. p 9-14.09
- El Agoze, M., J. Drezen, S. Renault, G. Periquet (1994) Analysis of the reproductive potential of diploid males in the wasp *diadromus pulchellus* (Hymenoptera: Ichneumonidae). Bulletin of entomological research 84, 213-218
- Enderlein, G. (1906) New honey bees and contribution to the distribution of the genus *apis*. Stet Entomol Ztg 67, 331-334
- Estoup, A., L. Garnery, M. Solignac, J.-M. Cornuet (1995) Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: Hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. Genetics 140, 679-695
- Evans, J.D., D.L. Lopez (2002) Complete mitochondrial DNA sequence of the important honey bee pest, *Varroa destructor*
- (Acari: Varroidae). Experimental & applied acarology 27, 69-78
- Fabricius, J. (1787) Mantissa insectorum,... 2: 1—382. CG Proft, Hafniae,

- Fabricius, J. (1793) *Entomologia systematica emendata et aucta*. CG Proft, Hafniae [= Copenhagen],
- FAO (2014) A Madagascar, avoir stoppé l'invasion acridienne n'exclut pas un grand risque de résurgence.
- Fazier, M., E. Muli, T. Conklin, D. Schmehl, B. Torto, J. Frazier, J. Tumlinson, J.D. Evans, S. Raina (2010) A scientific note on *Varroa destructor* found in east africa; threat or opportunity? *Apidologie* 41, 463-465
- Fernandez, N., Y. Coineau (2002) *Varroa*, tueurs d'abeilles. Bien le connaître, pour mieux le combattre, edition atlantica, biarritz,
- Franck, P., L. Garnery, A. Loiseau, B. Oldroyd, H. Hepburn, M. Solignac, J.M. Cornuet (2001) Genetic diversity of the honey bee in Africa: Microsatellite and mitochondrial data. *Heredity* 86, 420-430
- Free, J.B. (1970) *Insect pollination of crops*. Insect pollination of crops,
- Free, J.B. (1987) *Pheromones of social bees*, Chapman and Hall
- Fries, I., H. Hansen, A. Imdorf, P. Rosenkranz (2003) Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in sweden. *Apidologie* 34, 389-398
- Fries, I., W. Huazhen, S. Wei, C.S. Jin (1996) and *Apis mellifera ligustica*.
- Fries, I., A. Imdorf, P. Rosenkranz (2006) Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a nordic climate. *Apidologie* 37, 564-570
- Fries, I., P. Rosenkranz (1996) Number of reproductive cycles of *Varroa jacobsoni* in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Experimental & applied acarology* 20, 103-112
- Frisch, V. (1967) *The dance language and orientation of bees*. Harvad University Press, Cambridge, MA,
- Frumhoff, P.C., J. Baker (1988) A genetic component to division of labour within honey bee colonies. *Nature* 333, 358-361
- Gallai, N., J.-M. Salles, B.E. VAISSIERE (2009) Évaluation de la contribution économique du service de pollinisation à l'agriculture européenne. *Bull Tech Apic* 36, 110-116
- Ganzhorn, J.U., P.P. Lowry, G.E. Schatz, S. Sommer (2001) The biodiversity of Madagascar: One of the world's hottest hotspots on its way out. *Oryx* 35, 346-348
- Garcia Fernandez, P. (1997) Influence of the environment and the host on parasitization by *varroa jacobsoni* oud. 33-47. The Varroosis in the Mediterranean Region *Cahiers Options Méditerranéennes* 21, 103

- Garnery, L., J.M. Cornuet, M. Solignac (1992) Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology* 1, 145-154
doi:10.1111/j.1365-294X.1992.tb00170.x
- Garnery, L., M. Solignac, G. Celebrano, J.M. Cornuet (1993) A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial-DNA to study the genetic structure of *Apis-mellifera l.* *Experientia* 49, 1016-1021
- Garrido, C., P. Rosenkranz (2003) The reproductive program of female *Varroa destructor* mites is triggered by its host, *apis mellifera*. *Experimental & applied acarology* 31, 269-273
- Gautier, L., S. Goodman (2003) Introduction to the flora of Madagascar. The natural history of Madagascar, 229-250
- Genersch, E., M. Aubert (2010) Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*apis mellifera l.*). *Veterinary research* 41, 54
- Gramacho, K., L. Gonçalves (2009) Sequential hygienic behavior in carniolan honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Genetics and Molecular Research* 8, 655-663
- Gregory, P.G., J.D. Evans, T. Rinderer, L. De Guzman (2005) Conditional immune-gene suppression of honey bees parasitized by varroa mites. *Journal of Insect Science* 5,
- Hadley, A.S., M.G. Betts (2012) The effects of landscape fragmentation on pollination dynamics: Absence of evidence not evidence of absence. *Biological Reviews* 87, 526-544
- Han, F., A. Wallberg, M.T. Webster (2012) From where did the western honey bee (*Apis mellifera*) originate? *Ecology and evolution* 2, 1949-1957
- Harbo, J.R., J.W. Harris (2005) Suppressed mite reproduction explained by the behaviour of adult bees. *J apic Res* 44, 21-23
- Heimpel, G.E., J.G. de Boer (2008) Sex determination in the hymenoptera. *Annu Rev Entomol* 53, 209-230
- Ifantidis, M. (1983) Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honey bee brood cells. *Journal of Apicultural Research*,
- Imdorf, A., J.-D. Charrière, V. Kilchenmann, S. Bogdanov, P. Fluri (2003) Alternative strategy in central europe for the control of *Varroa destructor* in honey bee colonies. *Apiacta* 38, 258-278
- Kerr, W., S.d.L. Del Rio, M. Barrionuevo (1982) The southern limits of the distribution of the africanized honey bee in south america (*Apis mellifera adansonii*). *American Bee Journal*,

- Klein, A.-M., B.E. Vaissiere, J.H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S.A. Cunningham, C. Kremen, T. Tscharntke (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274, 303-313
- Koechlin, J. (1972) Flora and vegetation of madagascar Biogeography and ecology in Madagascar.(pp145-190). Springer
- Koeniger, N., G. Koeniger, N.H. Wijayagunasekara (1981) Beobachtungen über die anpassung von *Varroa jacobsoni* an ihren natürlichen wirt apis cerana in sri lanka. *Apidologie* 12, 37-40
- Kralj, J., S. Fuchs (2006) Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested apis mellifera foragers. *Apidologie* 37, 577-587
- Krantz, G., D. Walter (2009) A manual of acarology, 3rd. Lubbock, TX: Texas Tech University Press
- Kraus, B., R.E. Page (1995) Effect of *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae) on feral apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) in california. *Environmental Entomology* 24, 1473-1480
- Kuenen, L., N. Calderone (1997) Transfers of varroa mites from newly emerged bees: Preferences for age-and function-specific adult bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behavior* 10, 213-228
- Kull, C.A. (2002) Madagascar aflame: Landscape burning as peasant protest, resistance, or a resource management tool? *Political Geography* 21, 927-953
- Latreille, P. (1804) Notice des espeâces d'abeilles vivant en grande société, ou abeilles proprement dites et description d'espeâces nouvelles. *Ann Mus Natl Hist Nat* 5, 161-178
- Le Conte, Y., G. Arnold, J. Trouiller, C. Masson, B. Chappe, G. Ourisson (1989) Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honey bees by simple aliphatic esters. *Science* 245, 638-639
- Lecointre, G., H. Le Guyader (2001) Classification phylogénétique du vivant, Belin
- Locke, B., Y.L. Conte, D. Crauser, I. Fries (2012) Host adaptations reduce the reproductive success of *Varroa destructor* in two distinct european honey bee populations. *Ecology and evolution* 2, 1144-1150
- Lodesani, M., A. Pellacani, S. Bergomi, E. Carpana, T. Rabitti, P. Lasagni (1992) Residue determination for some products used against *Varroa* infestation in bees. *Apidologie* 23, 257-272

- Martin, S. (1994) Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. In worker brood of the honey bee *Apis mellifera* L. Under natural conditions. Experimental & applied acarology 18, 87-100
- Martin, S. (1995) Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. In drone brood of the honey bee *Apis mellifera* L. Under natural conditions. Experimental & applied acarology 19, 199-210
- Martin, S. (1998) A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Ecological Modelling 109, 267-281
- Martin, S., K. Holland, M. Murray (1997) Non-reproduction in the honey bee mite *Varroa jacobsoni*. Experimental & applied acarology 21, 539-549
- Martin, S.J., P. Kryger (2002) Reproduction of *Varroa destructor* in south african honey bees: Does cell space influence Varroa male survivorship? Apidologie 33, 51-62
- Meixner, M.D., M.A. Leta, N. Koeniger, S. Fuchs (2011) The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of *Apis mellifera*: *Apis mellifera simensis* n. Ssp. Apidologie 42, 425-437 :
- Meixner, M.D., M.A. Pinto, M. Bouga, P. Kryger, E. Ivanova, S. Fuchs (2013) Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*.
- Michener, C.D. (1965) A classification of the bees of the Australian and South Pacific regions. Bulletin of the AMNH; v. 130.
- Michener, C.D. (2000) The bees of the world, vol 1, JHU Press
- Mikawa, F. A study on the extermination of *Varroa jacobsoni*. In: Proceedings of the XXXth International Congress of Apiculture (1986), 1986. p 178-179
- Milani, J.T.N. (1999) Stimulation of *Varroa jacobsoni* Oud. Oviposition.
- Morais, M., T. Franco, R. Pereira, D. De Jong, L. Gonçalves (2009) Africanized honey bees are efficient at detecting, uncapping and removing dead brood. Genetics and Molecular Research 8, 718-724
- Moretto, G., L. Gonçalves, D. De Jong, M. Bichuette (1991) The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* Oud infestations in Brazil. Apidologie 22, 197-203
- Moritz, R.F. (1985) Heritability of the postcapping stage in *Apis mellifera* and its relation to varroa resistance. Journal of Heredity 76, 267-270
- Moritz, R.F., M. Jordan (1992) Selection of resistance against *Varroa jacobsoni* across caste and sex in the honey bee (*Apis mellifera* L., Hymenoptera: Apidae). Experimental & applied acarology 16, 345-353

- Myers, N., R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, G.A. Da Fonseca, J. Kent (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853-858
- Najafgholian, J., G. Thahmasbi, A. Pakdel, G. Nehzati (2011) Effect of population size on the expression of hygienic behavior in the iranian honey bee (*Apis Mellifera meda*)
- Navajas, M., D.L. Anderson, L.I. de Guzman, Z.Y. Huang, J. Clement, T. Zhou, Y. Le Conte (2010) New asian types of varroa destructor: A potential new threat for world apiculture. *Apidologie* 41, 181-193
- Navajas, M., A. Migeon, C. Alaux, M.-L. Martin-Magniette, G. Robinson, J. Evans, S. Cros-Arteil, D. Crauser, Y. Le Conte (2008) Differential gene expression of the honey bee *apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *BMC genomics* 9, 301
- Nazzi, F. (1994) Under laboratory conditions.
- Neumann, P., N.L. Carreck (2010) Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research* 49, 1-6
- Nicodemo, D., D. De Jong, R. Couto, E. Malheiros (2013) Honey bee lines selected for high propolis production also have superior hygienic behavior and increased honey and pollen stores. *Genetics and molecular research: GMR* 12, 6931
- O'Toole, C., A. Raw (1991) *Bees of the world*, Blandford Press
- Oudemans, A.C. (1904) On a new genus and species of parasitic acari. *Notes Leyden Mus* 24, 216-222
- Page , R.E., C.Y.-S. Peng (2001) Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera l.* *Experimental gerontology* 36, 695-711
- Palmer, K.A., B.P. Oldroyd (2000) Evolution of multiple mating in the genus *apis*. *Apidologie* 31, 235-248
- Panasiuk, B., W. Skowronek, D. Gerula (2009) Effect of period of the season and environmental conditions on rate of cleaning cells with dead brood. *J apic Sci* 53, 95-103
- Panasiuk, B. (2010) Age of workers bees performing hygienic behaviour in a honeybee colony. *Journal of Apicultural Science*
- Paxton, R.J. (2005) Male mating behaviour and mating systems of bees: An overview. *Apidologie* 36, 145-156
- Peng, Y., Y. Fang, S. Xu, L. Ge (1987) The resistance mechanism of the asian honey bee, *Apis cerana fabr.*, to an ectoparasitic mite, *Varroa jacobsoni* oudemans. *Journal of invertebrate pathology* 49, 54-60

- Pereira, R.A., M.M. Morais, T.M. Franco, L.S. Gonçalves (2013) Hygienic behavior of africanized honey bees *Apis mellifera* directed towards brood in old and new combs during diurnal and nocturnal periods. *Insects* 4, 521-532
- Petters, R.M., R.V. Mettus (1980) Decreased diploid male viability in the parasitic wasp, *bracon hebetor*. *Journal of Heredity* 71, 353-356
- Piccirillo, G.A., D. De Jong (2003) The influence of brood comb cell size on the reproductive behavior of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* in africanized honey bee colonies. *Genet Mol Res* 2, 36-42
- Radloff, S.E., C. Hepburn, H.R. Hepburn, S. Fuchs, S. Hadisoelilo, K. Tan, M.S. Engel, V. Kuznetsov (2010) Population structure and classification of *Apis cerana*. *Apidologie* 41, 589-601
- Ralalaharisoa-Ramamonjisoa, Z., H. Ralimananai, D. Lobreau-Callen (1996) Comportement de butinage d'*Apis mellifera var unicolor* (Hymenoptera, apidae) dans divers biotopes. *Biogéographie de Madagascar*, 517-522
- Ramanoelina, P.A., E.M. Gaydau, J. (2003) Bianchini Caractérisation des huiles essentielles industrielles de niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) de Madagascar propositions d'avant-projet de normes.
- Rath, W., W. Drescher (1990) Response of *Apis cerana* Fabr. Towards brood infested with *Varroa jacobsoni* Oud. and infestation rate of colonies in Thailand. *Apidologie* 21, 311-321
- Rinderer, T.E., J.W. Harris, G.J. Hunt, L.I. de Guzman (2010) Breeding for resistance to *Varroa destructor* in North America. *Apidologie* 41, 409-424
- Ritter, W., D. De Jong (1984) Reproduction of *Varroa jacobsoni* Oud in Europe, the middle east and tropical south america. *Z Ang Entomol* 98, 55-57
- Rosenkranz, P., P. Aumeier, B. Ziegelmann (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of invertebrate pathology* 103, S96-S119
- Rothenbuhler, W. (1979) Semidomesticated insects: honey bee breeding. *Genetics in Relation to Insect Management*, 84-92
- Rothenbuhler, W.C. (1964) Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. Iv. Responses of F1 and backcross generations to disease killed brood. *American Zoologist*, 111-123
- Rutner, F., I. Tassencourt, J. Louveaux (1978) Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie* 9, 363-381
- Ruttner, F. (1988) *Biogeography and taxonomy of honey bees*, Springer-Verlag

- Ruttner, H. (1972) Untersuchungen über die flugaktivität und das paarungsverhalten der drohnen. V.-drohnensammelplätze und paarungsdistanz. *Apidologie* 3, 203-232
- Schöning, C., S. Gisder, S. Geiselhardt, I. Kretschmann, K. Bienefeld, M. Hilker, E. Genersch (2012) Evidence for damage-dependent hygienic behaviour towards *Varroa destructor* parasitised brood in the western honey bee, *Apis mellifera*. *The Journal of experimental biology* 215, 264-271
- Scott Schneider, S., G. DeGrandi-Hoffman, D.R. Smith (2004) The african honey bee: Factors contributing to a successful biological invasion. *Annual Review of Entomology* 49, 351-76
- Seeley, T.D. (1978) Life history strategy of the honey bee, *Apis mellifera*. *Oecologia* 32, 109-118
- Seeley, T.D. (1983) Division of labor between scouts and recruits in honey bee foraging. *Behavioral ecology and sociobiology* 12, 253-259
- Smith, F. (1858) Catalogue of the hymenopterous insects collected at sarawak, Borneo; mount ophir, malacca; and at singapore, by ar wallace.(continued.). *Journal of the Proceedings of the Linnean Society of London Zoology* 2, 89-130
- Solignac, M., D. Vautrin, A. Pizzo, M. Navajas, Y. Le Conte, J.M. Cornuet (2003) Characterization of microsatellite markers for the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives. *Molecular Ecology Notes* 3, 556-559
- Spivak, M. (1996) Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 27, 245-260
- Spivak, M., M. Gilliam (1998) Hygienic behavior of honey bees and its application for control of brood diseases and Varroa. *Bee world* 79, 169-186
- Spivak, M., G.S. Reuter (2001) Resistance to american foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* 32, 555-565
- Storey, M., J.J. Mahoney, A.D. Saunders, R.A. Duncan, S.P. Kelley, M.F. Coffin (1995) Timing of hot spot related volcanism and the breakup of Madagascar and India. *Science* 267, 852-855
- Szabo, T.I., C.T. Walker, A.E. Mueller (1996) Grooming behavior as a varroa resistance characteristic in honey bee colonies. *American bee journal* (USA),
- Tingek, S. (1996) Description of a new cavity nesting species of apis (*Apis nuluensis* n. Sp.) from sabah, borneo, with notes on its occurrence and reproductive biology (insecta: Hymenoptera: Apoidea: Apini). *Senckenbergiana Biologica* 76, 115-119

- Trouiller, J., G. Arnold, B. Chappe, Y. Le Conte, C. Masson (1992) Semiochemical basis of infestation of honey bee brood by *Varroa jacobsoni*. Journal of chemical ecology 18, 2041-2053
- Vaknin, Y. (2012) The significance of pollination services for biodiesel feedstocks, with special reference to *jatropha curcas* L.: A review. Bioenergy Research 5, 32-40
- Vidal-Naquet, N. 2008. <http://www.apivet.eu/varroacycle.html>. Consulté le 07/10/2012
- Whitfield, C.W., S.K. Behura, S.H. Berlocher, A.G. Clark, J.S. Johnston, W.S. Sheppard, D.R. Smith, A.V. Suarez, D. Weaver, N.D.
- Tsutsui (2006) Thrice out of africa: Ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. Science 314, 642-645
- Wilde, J., S. Fuchs, J. Bratkowski, M. Siuda (2005) Distribution of *Varroa destructor* between swarms and colonies. Journal of Apicultural Research 44, 190
- Wilde, J.d., J. Beetsma (1982) The physiology of caste development in social insects. Advances in Insect Physiology 16, 167-246
- Williams, I., J. Pickett, A. Martin (1982) Nasonov pheromone of the honey bee. *Apis mellifera* L.(Hymenoptera, apidae). Journal of chemical ecology 8, 567-574
- Wilson, E.O. (1971) The insect societies. The insect societies.
- Winston (1987) The biology of the honey bee.
- Woyke, J. (1955) Multiple mating of the honey bee queen (*Apis mellifica* L.) in one nuptial flight. Bull Acad Polon Sci Cl II 3, 175-180

PUBLICATIONS :

-
- RASOLOFOARIVAO Henriette, CLEMENCET Johanna, RAVELOSON RAVAOMANARIVO Lala Harivelo, RAZAFINDRAZAKA Dimby, REYNAUD Bernard, DELATTE Hélène. 2013. Spread and strain determination of Varroa destructor (Acari: Varroidae) in Madagascar since its first report in 2010. Experimental and Applied Acarology. 60:521-530.
 - RASOLOFOARIVAO Henriette, CLEMENCET Johanna, RAVELOSON RAVAOMANARIVO Lala Harivelo, RAZAFINDRAZAKA Dimby, REYNAUD Bernard, DELATTE Hélène. 2013. Typage génétique et distribution de l'ectoparasite Varroa destructor (Acari : varroidae) à Madagascar depuis sa première description en 2010. La Santé de l'Abeille. 255 :290-303.
 - RASOLOFOARIVAO Henriette, CLEMENCET Johanna, TECHER Maéva Angélique, RAVELOSON RAVAOMANARIVO Lala Harivelo, REYNAUD Bernard, DELATTE Hélène. 2014. Genetic diversity of the endemic honeybee: Apis mellifera unicolor (Hymenoptera: Apidae) from Madagascar. (article soumis à Apidologie).
 - RASOLOFOARIVAO Henriette, DELATTE Hélène, RAVELOSON RAVAOMANARIVO Lala Harivelo, REYNAUD Bernard, CLEMENCET Johanna, 2014. Assessing hygienic behavior of Apis mellifera unicolor (Hymenoptera: Apidae), the endemic honey bee from Madagascar. Genetics and Molecular Research (article accepté sous réserve de correction).
 - RASOLOFOARIVAO Henriette, CLEMENCET Johanna, SPECK Adrien, RAVELOSON RAVAOMANARIVO Lala Harivelo, REYNAUD Bernard, DELATTE Hélène. 2014. Nuclear genetic diversity of Varroa destructor (Mesostigmata: Varroidea), invasive species reported in honey bee Apis mellifera unicolor (Hymenoptera: Apoidea). Experimental and Applied Acarology (article en cours de préparation).

COMMUNICATION AUX CONGRES :

- RASOLOFOARIVAO Henriette, CLEMENCET Johanna, RAVELOSON RAVAOMANARIVO Lala Harivelo, RAZAFINDRAZAKA Dimby, REYNAUD Bernard , DELATTE Hélène. 2012. Spread and strain determination of Varroa destructor since its first description in Madagascar in 2010. Communication affichée. Congrès Eurbee 5. Halle, Allemagne.
- RASOLOFOARIVAO Henriette, CLEMENCET Johanna, TECHER Maéva Angélique, RAVELOSON RAVAOMANARIVO Lala Harivelo, REYNAUD Bernard, DELATTE Hélène. 2014. Genetic diversity of the endemic honeybee: Apis mellifera unicolor (Hymenoptera: Apidae) from Madagascar. Communication affichée. Congrès Eurbee 6. Murcia, Espagne.